

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DPTO. DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR I**



X-53-381807-8

**INTRODUCCION A LA BIOLOGIA
MOLECULAR DE *Scedosporium prolificans*
(*Fungi Imperfecti*)**

MEMORIA
que para optar al grado de
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS
presenta

BEATRIZ RUIZ DIEZ

Director:
Dr.D. Joaquín V. Martínez-Suárez

Septiembre, 1999



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

El presente trabajo se ha desarrollado en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, bajo la dirección del Dr. D. Joaquín Martínez-Suárez, a quién agradezco su dedicación, ayuda y todas las enseñanzas recibidas que me han introducido en el fascinante “mundo” de los hongos.

Quiero manifestar mi agradecimiento al Dr. D. Juan Luis Rodríguez-Tudela por el gran apoyo que me ha prestado a lo largo de todos estos años.

También agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, a los que están y a los que ya se han ido, por la ayuda proporcionada en todo momento. No puedo dejar de mencionar a Teresa con quién empecé en el laboratorio, y a Paco con quién colaboré en una parte de esta Tesis.

De igual manera me gustaría expresar mis agradecimientos a los compañeros del servicio de Parasitología y de los Centros Nacionales de Microbiología y de Biología Fundamental.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social por concederme una Beca de Incorporación al Instituto de Salud Carlos III que me ha permitido desarrollar y terminar este proyecto.

Asimismo quiero agradecer a la Dra. Dña. Teresa Villalba, mi tutora en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular I por la colaboración que me ha manifestado.

A mi familia y amigos por el interés que han demostrado en mi trabajo y los ánimos que me han prestado sin los cuales hubiera sido difícil finalizar.

Finalmente, aunque no el último, a Paco por el gran apoyo que me ha mostrado en todo momento y la paciencia que ha tenido.

ABREVIATURAS

λ , longitud de onda

A, absorbancia

AFLP, polimorfismos en el tamaño de los fragmentos amplificados por PCR
(amplification fragment length polymorphisms)

APD, agar patata dextrosa

ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection)

CBS, Colección Holandesa de Hongos (Centraalbureau voor Schimmelcultures)

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

CIF, concentración inhibitoria fraccionaria

CLP, polimorfismos en el tamaño de los cromosomas (chromosomal length
polymorphisms)

CMF, concentración mínima fungicida

CMI, concentración mínima inhibitoria

CNMM, Centro Nacional de Microbiología/Miceliales

hph, gen de la fosfotransferasa de higromicina B de *E. coli* (hygromycin B
phosphotransferase)

IGS, espaciadores intergénicos no transcritos (intergenic spacers)

ITS, espaciador interno transcrito (internal transcribed spacers)

kb, kilobases

MAAP, perfiles arbitrarios múltiples de los amplificados (multiple arbitrary amplicon
profiling)

NCCLS, Comité americano para los estándares de laboratorios clínicos (National
Committee for Clinical Laboratory Standards)

NCPF, Colección Inglesa de Hongos Patógenos (National Collection of Pathogenic Fungi)

pb, pares de bases

PD, caldo patata dextrosa

RAPD, amplificación aleatoria de DNA polimórfico (random amplification of polymorphic
DNA)

RFLP, polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción (restriction fragment
length polymorphisms)

Sab, caldo Sabouraud

UFC, unidades formadoras de colonias

XTT, sal sódica de (2,3-bis-[2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil]-2H-tetrazolil-5-carboxianilida)

INDICE

INTRODUCCION	1
1. <i>Scedosporium prolificans</i> . Descripción	1
2. Los métodos moleculares en estudios taxonómicos y filogenéticos	2
2.1. Estudios de sistemática molecular de <i>Scedosporium</i>	6
3. Antifúngicos	7
3.1. Principales grupos de antifúngicos usados en medicina	7
3.1.1. Polienos	7
3.1.2. Fluorocitosina	8
3.1.3. Azoles	8
3.2. Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos	9
3.2.1. Métodos para determinar la sensibilidad a antifúngicos de hongos filamentosos	9
3.2.2. Pruebas alternativas para caracterizar la sensibilidad a antifúngicos	10
3.3. Resistencia a los antifúngicos	11
3.3.1. Alternativas al problema de la resistencia	13
3.3.1.1. Combinaciones de antimicrobianos	13
4. Factores de virulencia	15
4.1. Termotolerancia y crecimiento sumergido	15
4.2. Dimorfismo y variabilidad fenotípica	16
4.3. Melanina	16
4.4. Velocidad de crecimiento	17
4.5. Resistencia a antimicrobianos	17
5. Métodos de tipificado de microorganismos	19
5.1. Consideraciones generales	19
5.2. Polimorfismos en el tamaño de los fragmentos amplificados por PCR (AFLP)	21
5.2.1. Perfiles arbitrarios múltiples de los amplificados (MAAP)	21
5.2.2. "PCR-fingerprinting"	23
5.3. Métodos de tipificación de <i>S. prolificans</i>	24
6. Introducción a la genética fúngica	25
6.1. Aislamiento de mutantes	25
6.2. Transformación genética de hongos filamentosos	26
6.2.1. Métodos de transformación	27
6.2.2. Marcadores de selección	29
6.2.3. Destinos del DNA transformante	30
6.2.3.1. Vectores de replicación autónomos	30
6.2.3.2. Transformación por integración del DNA en los cromosomas	31
OBJETIVOS	33

MATERIALES	34
1. Material biológico	34
1.1. Bacterias y bacteriófagos	34
1.2. Plásmidos y cósmidos	34
1.3. Hongos	34
2. Medios de cultivo	36
2.1. Bacterianos	36
2.2. Micológicos	36
3. Productos y reactivos	37
3.1. Antimicrobianos	37
3.2. Enzimas	37
3.3. Oligodesoxinucleótidos	38
3.4. Otros productos y reactivos químicos	38
4. Tampones y soluciones	39
MÉTODOS	40
1. Micología	40
1.1. Cultivo de hongos filamentosos en medio sólido	40
1.2. Obtención de esporas a pequeña escala	41
1.3. Cultivo de hongos filamentosos en medio líquido	41
1.4. Obtención de esporas a gran escala	41
1.5. Conservación de hongos filamentosos	41
1.6. Identificación fenotípica	42
2. Sensibilidad a antifúngicos	42
2.1. Preparación del inóculo	42
2.2. Cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	43
2.2.1. Técnica de microdilución	43
2.2.2. Técnica de macrodilución	43
2.2.3. Técnica de dilución en agar	44
2.3. Cálculo de la concentración mínima fungicida (CMF)	45
2.3.1. Curvas de mortalidad	45
2.3.2. Eficiencia de plaqueo	46
2.4. Combinaciones de antimicrobianos	46
2.4.1. Prueba rápida por macrodilución	46
2.4.2. Método del tablero de ajedrez	47
2.4.3. Curvas de mortalidad	48
2.5. Medida del daño celular	49
2.5.1. Daño celular producido por un antifúngico	49
2.5.2. Daño celular producido por dos antifúngicos	50
3. Métodos generales de bacteriología y genética molecular	51
3.1. Manipulación de bacterias	51
3.1.1. Cultivo y conservación de bacterias	51
3.1.2. Preparación de bacterias competentes y transformación	51
3.1.3. Purificación del DNA plasmídico	51
3.1.4. Obtención del DNA plasmídico de cadena sencilla	51

3.2. Manipulaciones enzimáticas básicas	52
3.3. Electroforesis en geles de agarosa	52
3.4. Secuenciación	52
4. Aislamiento de DNA de hongos filamentosos	52
4.1. A pequeña escala	52
4.2. A media escala	53
4.3. Purificación del DNA fúngico	54
4.4. Cuantificación del DNA	54
5. Métodos moleculares de identificación de especies	55
5.1. Reacción de amplificación del rDNA	55
5.2. Análisis de restricción de los productos de PCR	55
5.3. Clonaje del DNA y secuenciación	56
5.4. Análisis de las secuencias de DNA	56
6. Métodos moleculares de caracterización subespecífica	56
6.1. Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD)	56
6.2. PCR dirigida a minisatélites de eucariotas ("PCR-fingerprinting")	57
6.3. Análisis de las reacciones de amplificación	57
7. Obtención de mutantes	58
7.1. Aislamiento de mutantes espontáneos	58
7.2. Obtención de mutantes inducidos con luz UV	58
7.2.1. Curvas de dosis-supervivencia	58
7.2.1.1. Preparación del inóculo	58
7.2.1.2. Supervivencia a la luz UV	58
7.2.1.3. Recuento de supervivientes	59
7.2.2. Curvas de aparición de mutantes	59
8. Transformación genética de <i>S. prolificans</i>	59
8.1. Electroporación	59
8.2. Análisis molecular de los transformantes	61
8.2.1. PCR	60
8.2.2. Hibridación por el método de Southern	61
RESULTADOS	62
1. Identificación molecular de especies. Taxonomía molecular del género <i>Scedosporium</i>	62
1.1. Análisis de restricción de la región ITS1-5,8S-ITSII	62
1.2. Secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITSII	65
2. Análisis de la interacción de los antifúngicos con <i>S. prolificans</i>	68
2.1. La resistencia a antifúngicos de <i>S. prolificans</i>	68
2.1.1. Técnica de microdilución	68
2.1.2. Curvas de mortalidad con anfotericina B	69
2.1.3. Eficiencia de plaqueo	70
2.1.4. Daño celular	70
2.2. Alternativas al problema de la resistencia: nuevos compuestos o combinaciones	71
2.2.1. Prueba rápida por macrodilución	71
2.2.2. Método del tablero de ajedrez	73

2.2.3. Curvas de mortalidad	76
2.2.4. Daño celular producido por dos antifúngicos	77
3. Análisis de la virulencia de <i>S. prolificans</i>	79
3.1. Sensibilidad a cicloheximida	79
3.2. Termorresistencia	79
3.3. Velocidad de crecimiento	79
3.4. Dimorfismo	80
3.5. Síntesis de melanina	81
4. Epidemiología molecular de <i>S. prolificans</i>	82
4.1. Puesta a punto	82
4.1.1. Tipificabilidad y poder de discriminación	82
4.1.2. Reproducibilidad	83
4.2. Aplicación a un brote de infección nosocomial causado por <i>S. prolificans</i> en una unidad de hematología	87
4.3. Caracterización por “PCR-fingerprinting” de un segundo brote de infección nosocomial causado por <i>S. prolificans</i>	88
5. Introducción al análisis genético de <i>S. prolificans</i>	92
5.1. Mutantes	92
5.1.1. Mutantes espontáneos	92
5.1.1.1. Mutantes albinos	92
5.1.1.2. Mutantes resistentes a cicloheximida	92
5.1.2. Mutantes inducidos con luz UV	92
5.1.2.1. Curvas dosis-supervivencia	92
5.1.2.2. Curvas de aparición de mutantes albinos	94
5.1.2.3. Estabilidad de los mutantes albinos	94
5.1.2.4. Análisis de los mutantes albinos	95
5.1.2.5. Mutantes resistentes a cicloheximida	98
5.2. Transformación genética de <i>S. prolificans</i>	100
5.2.1. Marcadores de selección	100
5.2.2. Vectores basados en el cósmido para ascomicetos pMLF2	100
5.2.2.1. Construcción de un vector específico para <i>S. prolificans</i>	100
5.2.3. Optimización de la transformación mediante electroporación	103
5.2.4. Transformación con diferentes vectores	106
5.2.5. Análisis de transformantes	107
5.2.5.1. Sensibilidad a higromicina B	107
5.2.5.2. Estabilidad de los transformantes	108
5.2.6. Análisis genético de los transformantes	109
DISCUSION	113
1. Taxonomía molecular de <i>S. prolificans</i>	113
1.1. Análisis del complejo ITS1-5,8S-ITSII de <i>Scedosporium</i> sp.	113
1.2. Evolución en el complejo ITS1-5,8S-ITSII de <i>Scedosporium</i> sp.	114
1.3. Análisis filogenético	115
2. La resistencia a antifúngicos de <i>S. prolificans</i>	117
2.1. Alternativas al problema de la resistencia	119
3. La melanina. Factores de virulencia de <i>S. prolificans</i>	123

4. Epidemiología molecular de <i>S. prolificans</i>	125
4.1. Métodos aplicados para caracterizar cepas de <i>S. prolificans</i>	127
4.2. Aplicación al estudio de brotes de infección nosocomial	129
4.2.1. Brote número 1	129
4.2.2. Brote número 2	130
5. Transformación genética de <i>S. prolificans</i>	131
5.1. Transformación con el marcador de resistencia a higromicina B	131
5.2. Aumento de la frecuencia de transformación con el vector que contiene rDNA de <i>S. prolificans</i>	133
5.3. Análisis de los transformantes	134
5.4. Perspectivas futuras	136
CONCLUSIONES	138
BIBLIOGRAFIA	140

INTRODUCCION

1. *Scedosporium prolificans*. DESCRIPCION

Scedosporium prolificans es un hongo filamentoso dematiáceo. Su hábitat natural no se conoce con seguridad, pero ha sido aislado de la tierra de plantas por lo que se le considera como un saprofito del suelo. Fue identificado por primera vez en una muestra clínica por Malloch y Salkin (1984) que lo consideraron una nueva especie que denominaron *Scedosporium inflatum*. Posteriormente se observó que era idéntico a *Lomentospora prolificans*, hongo ambiental descrito con anterioridad (Gueho y de Hoog, 1991), por lo que se propuso una nueva denominación: *Scedosporium prolificans*. Su similitud con *Scedosporium apiospermum* hizo que fuese incluido en su mismo género, aunque a diferencia de éste (*Pseudallescheria boydii*), a *S. prolificans* no se le conoce estado sexual o teleomorfo.

Crece sin dificultad en los medios de cultivo ordinarios para hongos. El color de sus colonias en agar patata (APD) a 30°C es gris-verdoso tirando hacia negro en el anverso y negro en el reverso. Las colonias crecen de manera extendida, formando masas húmedas con hifas aéreas cortas y finas. Con el tiempo desarrollan sectores grises de apariencia algodonosa (figura 26 de Resultados 5.1.2). El examen microscópico revela conidias ovoides, unicelulares y de paredes gruesas. Las células conidiógenas son anélides que pueden encontrarse solas a lo largo de las hifas o bien en el vértice de conidióforos sin ramificar. Estas células conidiógenas se caracterizan por presentar sus bases hinchadas y aneloconidias (solas o agrupadas) en sus ápices. Las hifas son hialinas y forman septos. Las conidias pueden surgir directamente de las hifas o bien de las anélides. Además *S. prolificans* se distingue de *S. apiospermum* y otros hongos muy parecidos (como *Scopulariopsis* sp.) porque no crece en medios de cultivo que contienen cicloheximida y porque crece a 45°C (Malloch y Salkin, 1984; Sutton *et al.*, 1998).

Desde que fue descrito por primera vez como patógeno humano, cada vez son más las comunicaciones de infecciones producidas por *S. prolificans*, tanto en pacientes no inmunocomprometidos como en inmunodeprimidos. La mayoría de los datos bibliográficos de aislamientos de *S. prolificans* proceden de España, Australia y California. Se puede resumir brevemente su espectro clínico (Berenguer *et al.*, 1997) ya que puede causar:

1. Colonizaciones asintomáticas: se aísla *S. prolificans* de uno o más lugares anatómicos sin evidencia clínica o histológica de infección.

2. Infecciones localizadas: es el aislamiento de *S. prolificans* en un sitio anatómico clínicamente infectado (tracto respiratorio, oído externo, heridas después de un traumatismo) sin existir hemocultivos positivos o evidencia de diseminación de la infección en otros sitios distantes.
3. Infecciones diseminadas: consisten en el aislamiento de *S. prolificans* con evidencias clínicas o histológicas de la infección en dos o más lugares anatómicos no contiguos y/o con hemocultivos positivos. Estas infecciones suelen presentarse después de una operación, un traumatismo o en enfermos inmunodeprimidos (sobre todo leucémicos).

S. prolificans es resistente a todos los antifúngicos disponibles y la progresión de sus infecciones depende del estado inmunológico del paciente, la extensión de la infección y la posibilidad de extirpación quirúrgica de los órganos o tejidos infectados. Las infecciones diseminadas que provoca suelen ser de desenlace fatal (Wood *et al.*, 1992).

2. LOS METODOS MOLECULARES EN ESTUDIOS TAXONOMICOS Y FILOGENETICOS

La taxonomía clásica denomina *fungi perfecti* a aquellos hongos que poseen reproducción sexual (estado teleomorfo) y *fungi imperfecti* a los que no poseen reproducción sexual o bien se desconoce (estado anamorfo). La forma de reproducción sexual mediante zigosporas, basidioesporas y ascosporas es la base de la clasificación de los hongos perfectos en zigomicetos, basidiomicetos y ascomicetos, respectivamente. Dentro de los deuteromicetos se incluyen todos los hongos en los que se desconoce la reproducción sexual, así como los estados anamorfos de todos los hongos perfectos.

Los métodos moleculares son ampliamente adoptados para estudiar la biodiversidad de los hongos. Desde el punto de vista médico, una de las áreas de mayor importancia es la identificación y clasificación de los agentes potenciales de micosis humanas, que implica el uso de los métodos moleculares para obtener datos taxonómicos mejores y más precisos. Los métodos clásicos de identificación tienen una resolución limitada porque muchos grupos de hongos, como por ejemplo las levaduras y los ascomicetos, muestran muy pocos caracteres morfológicos. Los taxones, que antes eran tratados como muy variables y circunscritos a pocas especies, ahora se presentan como una gama de pequeñas entidades, las cuales están sólo a veces remotamente relacionadas. Los métodos moleculares pueden ayudar a ordenar estos complejos (Mugnier, 1998). Cada una de las

entidades de un grupo en particular puede tener un nicho ecológico distinto, luego la clarificación taxonómica es importante porque puede revelar posibles rutas de infección. El análisis de genes fúngicos muy variables puede, a veces, demostrar que las cepas que habitan un nicho en particular, en el medio ambiente, son diferentes a las encontradas en los pacientes.

La segunda área de importancia en la aplicación de los métodos moleculares es la filogenia. Los grandes avances de la tecnología de la PCR han proporcionado nuevas fuentes de datos para la reconstrucción filogenética. La creciente facilidad para obtener secuencias de ácidos nucleicos, ha dado lugar a lo que hoy se denomina sistemática molecular (Bruns *et al.*, 1991). Un árbol filogenético puede ser considerado como un modelo del supuesto curso de la evolución (Mugnier, 1998). Ya que la evolución podría ser conducida por preferencias ecológicas, el modelo reflejaría el patrón de adaptación del hongo al hospedador humano. Por consiguiente, debería conducir a la evaluación de los factores que confieren patogenicidad al hongo. Si la patogenicidad es un proceso con varias etapas, su aparición se reflejará en el árbol filogenético en la forma de una rama monofilética, con un continuo incremento de la adaptación a las especiales condiciones de vida en el cuerpo humano.

Hay que considerar varios factores antes de elegir una región del DNA para realizar estudios taxonómicos y filogenéticos (Bruns *et al.*, 1991):

1. Debe evolucionar en una proporción apropiada: las regiones demasiado conservadas proveen de pocos cambios, y las regiones demasiado variables contendrán caracteres inconsistentes.
2. Idealmente debe presentarse como una sola copia, o debe evolucionar, por lo menos, como si fuera una región unicopia.
3. Debe tener la misma función en todos los taxones a estudiar. Las funciones diferentes implican cambios y distintas presiones de selección.
4. Debe examinarse el efecto de su composición de bases.

La unidad codificadora del RNA ribosómico nuclear, es decir, el rDNA, ha sido muy empleada con este fin. En la mayoría de los eucariotas, incluidos los hongos (Bruns *et al.*, 1991), el rDNA existe como una unidad de repetición en *tandem*. Cada unidad se compone de una copia de los tres genes más grandes (18S, 5,8S y 28S), separados por los espaciadores internos transcritos (ITS) y, a su vez, las unidades están separadas por los espaciadores intergénicos no transcritos (IGS). Los espaciadores transcritos son dos regiones del DNA que se transcriben y están presentes en el pre-rRNA, pero,

posteriormente, se eliminan y no aparecen en el producto ribosómico final. El gen 5,8S está típicamente flanqueado por los dos espaciadores transcritos, ITS I e ITS II, que lo separan de los genes 18S y 28S, respectivamente (figura 1). El orden de los genes está universalmente conservado, con la excepción del gen 5S, que puede estar o no entre las unidades de repetición. Las múltiples copias de la unidad de repetición se han homogeneizado rápidamente, por la vía de la evolución concertada, y por lo tanto se comportan generalmente como si fueran una sola copia del gen (Bruns *et al.*, 1991).

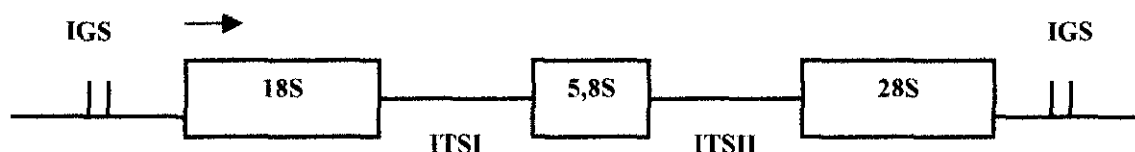


Figura 1. Representación esquemática de una unidad de transcripción del rDNA nuclear. Las cajas simbolizan los genes de las subunidades ribosómicas. La flecha señala el inicio y sentido de la transcripción.

La organización gen-espaciador-gen de la unidad de repetición es en parte una de las razones por las que el rDNA es tan popular. Algunas porciones de estas regiones génicas están tan conservadas que todas las sondas heterólogas hibridan con ellas; otras regiones génicas varían considerablemente, incluso a moderados niveles taxonómicos (White *et al.*, 1990; Bruns *et al.*, 1991). Por ejemplo, los genes de las subunidades 18S y 28S presentan zonas altamente conservadas en la evolución y otras que diferencian especies. La secuencia de la subunidad pequeña 5,8S ha evolucionado muy poco y puede estar conservada entre especies e incluso entre géneros. Los espaciadores internos transcritos (ITS) evolucionan más rápido y presentan variabilidad específica de especie, alcanzando, en algunas ocasiones, diferencias entre individuos de una misma especie. Las secuencias espaciadoras no transcritas (IGS) evolucionan muy rápidamente y pueden cambiar, incluso, entre cada uno de los miembros de las familias de genes en *tandem* (White *et al.*, 1990).

Los estudios comparativos de las secuencias de nucleótidos de los genes del rDNA han proporcionado significado al análisis de las relaciones filogenéticas a un amplio nivel taxonómico y también han detectado variaciones genéticas entre especies fúngicas muy relacionadas (White *et al.*, 1990). Una ventaja muy importante de emplear estas secuencias para estudios filogenéticos es que están presentes en todos los seres vivos. Además, como ya se ha explicado, no todas las partes de estas secuencias son igualmente

adecuadas para detectar cambios debido a que están sometidas a diferentes presiones de selección (Bruns *et al.*, 1991).

Los datos de las regiones codificantes (18S, 5,8S, y de algunos fragmentos de 28S) son útiles para establecer una primera escala (tosca) en la filogenia y para ordenar las diversas clases de los hongos ascomicetos al nivel de familias (Berbee *et al.*, 1995; Mugnier, 1998). Estas secuencias permiten la selección de iniciadores específicos y universales de hongos y de sondas que diferencien especies (White *et al.*, 1990).

La región más variable del rDNA (ITS) se ha empleado con éxito para evaluar las relaciones filogenéticas de diversas familias fúngicas a nivel inter e intraespecífico (Mugnier, 1998). Los ITS no se correlacionan con ninguna morfología en particular y no se conoce ninguna función para ellos (Bruns *et al.*, 1991). Su localización, flanqueada por genes conservados, permite su amplificación por PCR empleando iniciadores que se acoplan a secuencias de dichos genes (White *et al.*, 1990). La región completa ITS I-5,8S-ITS II es, generalmente, pequeña en los hongos (alrededor de 600 – 700 pb) y puede secuenciarse con facilidad.

Las secuencias de este complejo (ITS I-5,8S-ITS II) se pueden alinear con confianza (De Hoog *et al.*, 1998), ya que:

1. Los dominios variables (ITS I e ITS II) se encuentran intercalados entre una región más conservada (es decir, el rDNA 5,8S que presenta muy pocas sustituciones).
2. Las regiones con mutaciones en su longitud pueden ser registradas para obtener datos informativos para el análisis filogenético.

Está demostrada la utilidad de las regiones de los ITS para obtener relaciones de escala más finas (Mugnier, 1998). Por otro lado, Lobuglio *et al.* (1995) han demostrado que los resultados del análisis filogenético de esta región, coinciden con los del DNA que codifica para el RNA mitocondrial.

Esta región ha sido utilizada en análisis filogenéticos y taxonómicos de muchos hongos filamentosos, como, por ejemplo, *Neurospora* (Chambers *et al.*, 1986), *Penicillium* (Berbee *et al.*, 1995; Lobuglio y Taylor, 1995), *Trichophyton* (De Hoog *et al.*, 1998), *Trichoderma* (Kuhls *et al.*, 1996), *Fusarium sambucinum* (O'Donnell, 1992) y *Scedosporium* (Lennon *et al.*, 1994; Wedde *et al.*, 1998). El análisis de su secuencia muestra que en la mayoría de los casos está conservada entre especies dentro de un género (Berbee *et al.*, 1995; Mugnier, 1998), aunque en algunas especies fúngicas existe una pequeña variación intraespecífica (O'Donnell, 1992; Kuhls *et al.*, 1996).

2.1. ESTUDIOS DE SISTEMÁTICA MOLECULAR DE *Scedosporium*

En 1991 Guého y de Hoog demostraron, mediante experimentos de reasociación de DNA/DNA total, que el nuevo hongo patógeno *Scedosporium inflatum* era idéntico al hongo saprófito descrito años antes *Lomentospora prolificans*. Se propuso el nuevo nombre *Scedosporium prolificans*. Además, confirmaron que el género *Scedosporium* se componía de dos especies, *S. prolificans* y *S. apiospermum*.

Lennon *et al.* (1994), volvieron a comprobar la identidad existente entre *S. inflatum* y *L. prolificans*. Realizaron el análisis de restricción de la región ITS1-5,8S-ITS2. En ese trabajo se describe la secuencia del espaciador ITS1 de *S. prolificans* y *S. apiospermum* y una parte del espaciador ITS2 de *S. prolificans*. Estos autores sugieren la utilidad de los patrones de restricción de esta región para diferenciar las dos especies.

Issakainen *et al.* (1997) han realizado sus estudios moleculares del género *Scedosporium* secuenciando parte de la subunidad pequeña del rDNA (18S). Emplean esta zona para resolver las relaciones filogenéticas entre los estados teleomorfos y anamorfos de la familia *Microascaceae*. Indican que el rDNA 18S no es suficiente para alcanzar el nivel de identificación de especies, pero sí corresponde con los diferentes géneros teleomorfos. En definitiva, se confirma su utilidad sólo en investigaciones donde los géneros y amplios grupos de taxones se colocan en un gran contexto filogenético.

Con estos datos moleculares, el género imperfecto *Scedosporium* se divide en dos, *S. prolificans* y el complejo de *S. apiospermum*. Además de *P. boydii*, los hongos teleomorfos de la familia *Microascaceae* más próximos a *S. prolificans* parecen ser los del género *Petriella*.

Más recientemente, Wedde *et al.* (1998) han desarrollado un sistema de identificación por PCR de cepas de *Pseudallescheria/Scedosporium*. Los iniciadores que emplean están basados en la región ITS2. La PCR diseñada para *S. prolificans* es específica de especie, pero la diseñada para *P. boydii* no lo es: otras especies de *Pseudallescheria* dan positivo con esta reacción. Además, estos autores realizan un análisis filogenético tomando únicamente datos de la región ITS2, y sólo incluyen en el estudio las diferentes especies de *Pseudallescheria* y *S. prolificans*.

En esta Memoria (Ruiz-Díez y Martínez-Suárez, 1999) se ha comprobado que el análisis de la región ITS1-5,8S-ITS2 distingue entidades taxonómicas al nivel de las especies definidas en el género *Scedosporium*. También se ha conseguido mediante un

árbol filogenético general de hongos ascomicetos filamentosos, una posición filogenética más precisa de *S. prolificans*.

3. ANTIFUNGICOS

3.1. PRINCIPALES GRUPOS DE ANTIFUNGICOS USADOS EN MEDICINA

El número de antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis humanas es muy limitado (McGinnis y Rinaldi, 1996). Existen en la actualidad sólo tres grupos diferentes clasificados en base a su mecanismo de acción: (1) Alteración de la función de la membrana (polienos). (2) Inhibición de la síntesis del DNA o alteración de la composición del RNA (fluorocitosina). (3) Inhibición de la biosíntesis del ergosterol (azoles).

3.1.1. Polienos

La anfotericina B y otros polienos como la nistatina se unen a diversos esteroides de la membrana plásmica de los hongos sensibles, especialmente al ergosterol. Esta unión altera las funciones de la membrana, provocando la pérdida de protones intracelulares. La pérdida de otros componentes intracelulares en presencia de la anfotericina B es un efecto secundario debido a la disipación del gradiente de protones. A concentraciones más altas, los polienos producen grandes daños en la membrana con pérdida de proteínas intracelulares e, incluso, se llegan a inhibir las quitina-sintetasas. La anfotericina B también produce un daño directo oxidativo sobre los lípidos de la membrana. Los efectos letales de estos antifúngicos son el resultado final del daño producido en la membrana. La causa de su toxicidad en humanos es la unión a los esteroides de la membrana de las células de mamífero, como el colesterol.

Los hongos filamentosos patógenos son inhibidos *in vitro* por concentraciones de anfotericina B de aproximadamente 1 µg/ml (Espinell-Ingroff *et al.*, 1997), concentración que se puede alcanzar en la sangre con las dosis terapéuticas habituales. Las especies resistentes intrínsecamente a la anfotericina B son pocas, y entre estas se encuentra *S. prolificans*. *S. apiospermum* se considera de sensibilidad variable (Cuenca-Estrella *et al.*, 1999). Otros hongos filamentosos dematiáceos como *Wangiella dermatitidis* y *Alternaria alternata* también pueden tener CMI's elevadas (McGinnis y Rinaldi, 1996).

3.1.2. Fluorocitosina

La 5-fluorocitosina es el único inhibidor de la síntesis de macromoléculas entre los antifúngicos actualmente en uso, y también es el único en el que los mecanismos de acción y resistencia son bien conocidos. Inhibe dos rutas distintas: la del procesamiento del RNA y la de la síntesis del DNA, obteniéndose como resultado un RNA aberrante. La importancia relativa de estas dos rutas como causa de inhibición del crecimiento no se conoce con exactitud, ya que cualquiera de ellas por sí sola podría ser suficiente.

La actividad de la 5-fluorocitosina frente a los hongos filamentosos es escasa o nula. Sólo se ha encontrado alguna cepa aislada del género *Aspergillus* y los hongos causantes de cromoblastomycosis con CMI's bajas (McGinnis y Rinaldi, 1996).

3.1.3. Azoles

Los imidazoles y triazoles comparten, a grandes rasgos, los mecanismos de acción y resistencia, por lo que se suelen agrupar como derivados azólicos o azoles. Los únicos azoles empleados por vía oral o parenteral son dos imidazoles (miconazol y ketoconazol) y los triazoles (fluconazol, itraconazol y voriconazol).

Los azoles actúan de forma primaria inhibiendo la biosíntesis del ergosterol. La disminución del ergosterol y la acumulación de esteroides metilados debidas a la acción de los azoles alteran la estructura y funciones de la membrana celular, que se vuelve más vulnerable a daños posteriores. Diferentes sistemas enzimáticos unidos a la membrana, como los que participan en el transporte de nutrientes y en la síntesis de quitina, van a verse afectados. El resultado es la inhibición del crecimiento y, por lo tanto, los azoles son primariamente fungistáticos, lo que limita su utilidad.

Tanto los imidazoles como los triazoles son considerados como antifúngicos de amplio espectro, ya que son activos *in vitro* sobre dermatofitos, *Aspergillus* y otros hongos filamentosos. La única excepción la constituye el fluconazol que carece de actividad sobre *Aspergillus*, *Sporothrix*, *Rhizopus* y otros hongos filamentosos (Espinell-Ingroff *et al.*, 1995). Sin embargo, con *S. prolificans* todos los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* indican una total insensibilidad frente a los azoles (Berenguer *et al.*, 1997; Cuenca-Estrella *et al.*, 1999), lo que le diferencia de *S. apiospermum* que es relativamente sensible a todos los azoles excepto al fluconazol.

3.2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS

El concepto de sensibilidad y resistencia depende, en gran parte, del método utilizado en el laboratorio para determinar la respuesta de los hongos frente a los antifúngicos. Al igual que ocurre con los antibacterianos, la forma más habitual de medir si un hongo es sensible o resistente a los antifúngicos es mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para definir la CMI habitual del antifúngico frente a una especie es necesario realizar pruebas de sensibilidad frente a un número representativo de cepas y determinar cual es la distribución y la moda de las CMIs.

En el caso de los antifúngicos sistémicos, el límite entre una CMI que indique sensibilidad y otra que indique resistencia (concentración crítica o punto de corte) ha de tener en cuenta las concentraciones que se alcanzan en los fluidos corporales, en especial en el plasma sanguíneo, durante los tratamientos habituales. Este límite se ha de determinar empíricamente tras el estudio de la correlación entre los valores de las CMIs y las respuestas positivas y negativas a los tratamientos. Estos estudios son muy escasos en los hongos filamentosos. Ello se debe, fundamentalmente, a la falta de normalización de las pruebas de sensibilidad *in vitro* a antifúngicos.

3.2.1. Métodos para determinar la sensibilidad a antifúngicos de hongos filamentosos

El proceso de estandarización de las pruebas de sensibilidad a antifúngicos comenzó hace años. Los trabajos se encaminaron, en un principio, a la consecución de un método normalizado para evaluar la sensibilidad de levaduras, que fue propuesto por el subcomité de antifúngicos del "National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)" norteamericano en 1992. Este subcomité ha realizado diversas publicaciones que prepararon el camino para la estandarización de las pruebas de sensibilidad a antifúngicos de los hongos filamentosos (Espinel-Ingroff *et al.*, 1995; Espinel-Ingroff *et al.*, 1997). En este caso la preparación del inóculo es muy diferente ya que los hongos filamentosos no crecen como células simples. La única fase unicelular del ciclo vital de los hongos filamentosos son las conidias, por lo que todos los intentos de preparación del inóculo estandarizado se han centrado en suspensiones de conidias (Espinel-Ingroff y Kerkering, 1991). Las pruebas de sensibilidad miden la capacidad inhibitoria de los antifúngicos sobre la germinación de las conidias, que se sabe que se correlaciona con la actividad frente a las conidias germinadas (Manavathu *et al.*, 1999). Recientemente se ha

propuesto un método de referencia (NCCLS, 1998). Este método está basado en los resultados obtenidos con algunos de los hongos filamentosos patógenos formadores de conidias o esporas vegetativas, es decir, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizopus arrhizus* y *S. apiospermum*. Aunque se ha conseguido un método estandarizado para determinar la sensibilidad de los hongos filamentosos patógenos a los antifúngicos, todavía se deben llevar a cabo muchos estudios para lograr la correlación clínica de estos ensayos (Odds *et al.*, 1998).

Aunque los métodos de referencia son esenciales para la estandarización y las comparaciones interlaboratorio, no siempre son útiles para evaluar algunas combinaciones hongos-antifúngicos y tampoco son las técnicas más convenientes para el empleo como métodos de rutina en un laboratorio clínico. En paralelo al desarrollo de una metodología estandarizada, varios grupos han centrado sus esfuerzos en simplificar o mejorar los procedimientos, obteniendo resultados similares (Cuenca-Estrella *et al.*, 1999). Dentro de estos métodos se hallan los realizados en este trabajo (Métodos 2).

3.2.2. Pruebas alternativas para caracterizar la sensibilidad a antifúngicos

Además de los métodos que se podrían clasificar como habituales para determinar la sensibilidad a antifúngicos (macrodilución, microdilución y dilución en agar), existe un conjunto de pruebas que evalúan otros aspectos de la respuesta de los hongos frente a los antifúngicos.

Curvas de mortalidad. Es la estimación de la muerte de una población de microorganismos cuando se enfrenta a una concentración dada de un antimicrobiano, en función del tiempo. Este porcentaje se determina midiendo el número de células viables a intervalos periódicos de incubación. La gran diferencia de las curvas de mortalidad con respecto a las determinaciones de las CMI, es que miden de manera dinámica la capacidad fungicida del antimicrobiano. Las curvas de mortalidad no se utilizan de forma rutinaria para seguimiento terapéutico, probablemente por ser una técnica muy laboriosa. Se han aplicado a la evaluación de nuevos antifúngicos y para estudiar la sinergia entre dos o más agentes antimicrobianos (Eliopoulos y Moellering, 1996). Aunque en los hongos filamentosos no existe una metodología estandarizada, en la literatura se recogen bastantes trabajos realizados con *Aspergillus* (Hughes *et al.*, 1984; Clancy *et al.*, 1998; Viviani *et al.*, 1998).

Eficiencia de plaqueo. Se puede emplear esta técnica con diferentes objetivos. Uno de ellos es determinar la mínima concentración de antifúngico necesaria para provocar la muerte de la mayoría los microorganismos o concentración mínima fungicida (CMF). En hongos filamentosos, probablemente debido a la formación de hifas, no se ha empleado hasta ahora la eficiencia de plaqueo para determinar la CMF. Otra aplicación de esta técnica es la valoración del efecto del antifúngico sobre la viabilidad celular y de esta manera obtener las concentraciones subinhibitorias para el crecimiento fúngico.

Ensayo del daño celular medido por la sal de tetrazolio XTT. Las sales de tetrazolio son empleadas universalmente como indicadores de sistemas de reducción-oxidación. En hongos se han utilizado para evaluar el daño celular producido por los antifúngicos, en ensayos de adherencia y para determinar las CMIs. En la medida del daño celular se valora la acción del antifúngico en la actividad respiratoria y en el crecimiento o destrucción del hongo (Meshulam *et al.*, 1995). Los datos de estos ensayos deben interpretarse cautelosamente como un reflejo del daño celular, pero no de efectos letales. Las hifas pueden sufrir daños irreversibles en algunos segmentos celulares, mientras que otros pueden permanecer viables y permitir al hongo continuar creciendo. El daño celular producido por voriconazol sobre *A. fumigatus*, ha sido evaluado con éxito mediante la reducción del XTT (Vora *et al.*, 1998).

3.3. RESISTENCIA A LOS ANTIFUNGICOS

La resistencia de los hongos a los antifúngicos es un fenómeno al que hasta hace poco no se la había prestado mucha atención. El aumento de la población afectada por el virus de la inmunodeficiencia humana, del número de pacientes transplantados y de otros tipos de pacientes inmunosuprimidos, ha producido un incremento de las infecciones fúngicas, del uso de los antifúngicos y de la detección de hongos resistentes a los mismos (Pfaller, 1995; McGinnis y Rinaldi, 1996).

Hay algunos conceptos empleados con los antibacterianos que deben considerarse al hablar de los antifúngicos:

Resistencia intrínseca: se denominan así las especies en que todas las cepas son totalmente insensibles a un compuesto.

Resistencia primaria: cuando una cepa de una especie normalmente sensible posee una resistencia natural sin necesidad de haber entrado en contacto con el compuesto en cuestión.

Resistencia secundaria o adquirida: es la que alcanza una cepa como resultado del contacto con el antifúngico en cuestión. La resistencia secundaria puede adquirirse tanto *in vivo* como *in vitro*. En este segundo caso los mutantes pueden ser espontáneos o inducidos por mutágenos (Introducción 6.1.).

S. prolificans es un hongo multirresistente: estudios recientes han confirmado que todos los antifúngicos tienen poca actividad *in vitro* frente a este organismo (Cuenca-Estrella *et al.*, 1999). La otra especie de este género (*S. apiospermum*) es considerada sensible a miconazol, de sensibilidad variable frente a anfotericina B y resistente a fluconazol y 5-fluorocitosina (Cuenca-Estrella *et al.*, 1999). Se puede clasificar a *S. prolificans* como resistente intrínsecamente a todos los antifúngicos.

Los estudios para el análisis de la multirresistencia a los antifúngicos en hongos filamentosos se han realizado fundamentalmente con *Aspergillus nidulans* (Del Sorbo *et al.*, 1997). Pero en este caso se trata de una resistencia adquirida que puede ser debida a dos tipos de cambios fenotípicos: los que acentúan los procesos normales de defensa celular y aquellos que disminuyen o evitan el efecto tóxico del antifúngico. Varios mecanismos pueden producir estas alteraciones: disminución en la acumulación del antifúngico, alteración de las dianas, incremento en la reparación del daño celular y aumento de la inactivación del antifúngico. Los típicos determinantes de la multirresistencia adquirida en células eucariotas son las proteínas de transporte responsables del flujo de compuestos tóxicos. En *A. nidulans* existen varios determinantes genéticos asociados a esta multirresistencia adquirida (Del Sorbo *et al.*, 1997).

Sin embargo, la multirresistencia intrínseca es difícil de estudiar y es muy poco conocida. Los mecanismos que la producen deben ser diferentes a los antes mencionados. Uno de los datos más interesantes en relación con la resistencia intrínseca, es que la mayoría de los hongos dematiáceos presentan multirresistencia o CMI's muy elevadas a los antifúngicos (McGinnis y Rinaldi, 1996). Estos resultados parecen indicar que existe una relación entre la melanina y la resistencia (Perfect y Schell, 1996), relación que se comenta en el apartado 4.3. de la Introducción.

3.3.1. Alternativas al problema de la resistencia

Los agentes antifúngicos son a menudo inútiles para tratar las infecciones fúngicas, especialmente las producidas por *S. prolificans*. Existen dos aproximaciones para superar esta situación (Viviani *et al.*, 1998). Una es el empleo y/o el descubrimiento de nuevos antifúngicos o formulaciones. La segunda consiste en evaluar combinaciones de compuestos ya existentes. Con respecto a la primera posibilidad, puede resultar interesante la comprobación del efecto que pueden ejercer determinados antifúngicos ya descritos sobre *S. prolificans*.

Una característica singular de *S. prolificans* es su sensibilidad a cicloheximida (Malloch y Salkin, 1984). La mayor parte de los hongos filamentosos patógenos, incluido *S. apiospermum*, son resistentes a este antifúngico (Salkin, 1975), por lo que la cicloheximida se emplea en los medios selectivos de rutina para aislarlos (Sutton *et al.*, 1998). La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis de proteínas. Se define como un fungicida específico (con un sólo sitio de acción) que actúa primariamente impidiendo la transcripción mediante su unión a los ribosomas. A altas concentraciones puede afectar también a otros sitios, independientemente de su efecto sobre la síntesis de proteínas. En los hongos filamentosos su acción inmediata consiste en un retraso en la germinación de las esporas. Lamentablemente, no se puede emplear con fines terapéuticos por su toxicidad, pero se ha empleado en hongos como marcador genético para la selección de mutantes resistentes (Carlton y Brown, 1981).

El hecho de que *S. prolificans* sea sensible a un inhibidor de la síntesis de proteínas permite pensar que pudiera existir otro u otros compuestos que también la inhiban y para los que este hongo no sea resistente.

Tampoco está descrita en la literatura la actividad de otra serie de compuestos sobre *S. prolificans*. Entre ellos se pueden citar a inhibidores de las biosíntesis de los glucanos (candinas) y de la quitina de la pared celular (como la nikomicina).

3.3.1.1. Combinaciones de antimicrobianos

La escasez de antifúngicos disponibles hace que se estén evaluando, tanto *in vitro* como *in vivo*, todas sus combinaciones posibles en un intento de ofrecer más y mejores alternativas a la lucha contra las infecciones fúngicas. Esta posibilidad es especialmente atractiva en el caso de un hongo multirresistente como *S. prolificans*.

Al analizar el efecto de las combinaciones de dos o más antimicrobianos *in vitro*, se puede definir la existencia de varias situaciones distintas (Eliopoulos y Moellering, 1996):

- *Sinergismo*. Es la existencia de una interacción positiva. El efecto que produce la combinación de los antimicrobianos es mayor que el de cada uno por separado.
- *Antagonismo*. Es la existencia de una interacción negativa. La combinación de antimicrobianos tiene un menor efecto que cuando se utilizan en solitario.
- *Adición*. Es aquella interacción en la que la combinación de los antimicrobianos es la suma de los efectos de cada uno por separado.
- *Indiferencia*. La combinación de los antimicrobianos produce el mismo resultado que el más activo por separado.

Existen diversos métodos (Eliopoulos y Moellering, 1996) para determinar si la combinación de antifúngicos puede tener un efecto supuestamente beneficioso o, por el contrario, perjudicial. Estos son el método del tablero de ajedrez (con tubos o con placas de microdilución) y la realización de curvas de muerte. El método del tablero de ajedrez y las curvas de mortalidad dan unos resultados estimables de la interacción. Los datos que aportan son complementarios, ya que con el tablero de ajedrez se obtiene una visión de la inhibición del crecimiento y con las curvas de muerte de la actividad fungicida.

Los estudios de combinaciones de antimicrobianos y hongos filamentosos se han realizado esencialmente con *Aspergillus* (McGinnis y Rinaldi, 1996; Viviani *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos son conflictivos debido a los diferentes métodos empleados y a su baja reproducibilidad. Generalmente, en este tipo de trabajos se intenta combinar la anfotericina B con algún otro antifúngico o antibacteriano. La anfotericina B se enlaza con el ergosterol de la membrana fúngica y, por lo tanto, puede facilitar el transporte al interior de la célula de un segundo compuesto. Desde finales de los años 60, se ha intentado combinar la anfotericina B con rifampicina o con 5-fluorocitosina con resultados alentadores en infecciones experimentales producidas por *Aspergillus* sp. (Hughes *et al.*, 1984). En realidad, la 5-fluorocitosina se emplea siempre en combinación debido al desarrollo de resistencia que presentan todos los hongos. También se ha intentado combinar la anfotericina B con diversos azoles, obteniéndose *in vitro* resultados contradictorios (Viviani *et al.*, 1998). En este sentido, existe un trabajo que estudia esta combinación con *P. boydii*, obteniendo como resultado adición y/o indiferencia, dependiendo de la cepa (Walsh *et al.*, 1995). Se ha encontrado un aumento de la actividad de la anfotericina B frente a *Aspergillus* sp. producida por diferentes antibacterianos,

como los inhibidores de la síntesis de proteínas de la familia de las tetraciclinas (Hughes *et al.*, 1984) y los inhibidores de la síntesis del RNA (Clancy *et al.*, 1998).

En la actualidad no hay ningún trabajo en el que se hayan ensayado combinaciones de antimicrobianos frente a *S. prolificans*. Resulta muy interesante la posibilidad de analizar las combinaciones de antifúngicos e inhibidores de la síntesis de proteínas, tomando como modelo los trabajos realizados con *Aspergillus*. También se puede ensayar, de manera análoga, la actividad combinada de la anfotericina B con algunos antibacterianos y con inhibidores de la síntesis de melanina.

4. FACTORES DE VIRULENCIA

Los factores de virulencia son propiedades que aumentan la supervivencia, el crecimiento y la propagación del hongo dentro de los tejidos humanos. La supervivencia sólo de las hifas no es suficiente para que el hongo pueda adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales después de la muerte del tejido u órgano, ya que en este caso el hongo permanecería sin progeñe. Cuando el hongo se reproduce en el hospedador, su población está sujeta a la presión evolutiva y puede evolucionar hacia un estado superior de adaptación como un hongo comensal de humanos (Vartivarian, 1992).

A continuación se van a citar brevemente algunos de los factores generales de virulencia conocidos en los hongos patógenos humanos. En cualquier caso, hay que mencionar que los hongos son patógenos oportunistas por excelencia y que, por tanto, se trata de factores con propiedades potenciales de virulencia y cuyo papel en la patogénesis de las infecciones fúngicas sólo ha sido demostrado en determinadas ocasiones.

4.1. TERMOTOLERANCIA Y CRECIMIENTO SUMERGIDO

Los hongos patógenos son, generalmente, capaces de crecer a temperaturas superiores a 40°C, aunque el crecimiento a temperaturas por encima de 35°C es suficiente para causar micosis sistémicas (Sutton *et al.*, 1998).

Algunos hongos son capaces de crecer en inmersión como grupos compactos de hifas, formando los llamados micetomas. *S. prolificans*, *Fusarium* sp. y otros hongos (Perfect y Schell, 1996) son capaces de reproducirse mediante conidias sumergidas que permanecen en los tejidos humanos. Estas formas conidiógenas pueden ayudar al hongo a

diseminarse por el torrente sanguíneo y se postula que este sería uno de sus principales mecanismos de virulencia.

4.2. DIMORFISMO Y VARIABILIDAD FENOTÍPICA

El dimorfismo desempeña un papel esencial en la patogénesis de las infecciones diseminadas producidas por los hongos dimórficos como *Histoplasma capsulatum*. Una vez que las esporas son inhaladas, estos hongos pueden presentar una transición a la fase levaduriforme o bien esporular para establecer la infección. Estos cambios fenotípicos pueden estar asociados con diferencias en la interacción entre los organúlos fúngicos y las células inmunes del hospedador (Vartivarian, 1992). En un hongo que produce infecciones diseminadas fatales como *S. prolificans* es interesante la búsqueda de un posible dimorfismo.

4.3. MELANINA

Los hongos dematiáceos que son patógenos para los humanos, como *S. prolificans*, sintetizan pigmentos oscuros de naturaleza polimérica denominados genéricamente como melaninas. Dentro de estos hongos se incluyen muchos ascomicetos y deuteromicetos (Wheeler y Bell, 1988).

Las melaninas fúngicas son sintetizadas a partir de una gran variedad de precursores naturales. Se encuentran por lo general enlazadas a las paredes celulares, aunque también pueden ser de naturaleza extracelular (Wheeler y Bell, 1988). Estas melaninas fúngicas tienen muchas propiedades químicas en común con las producidas por los animales. Igual que éstas son muy difíciles de degradar y estudiar químicamente, aunque en los últimos años se han realizado muchos avances en su caracterización bioquímica y estructural.

En la mayoría de estos patógenos, su camino biosintético es la ruta de los pentaquétidos, también denominada del dihidroxinaftaleno (por ser el último compuesto intermedio de dicha ruta). Los inhibidores de esta ruta, especialmente el triciclazol, se emplean como confirmación del tipo de melanina presente en estos hongos. Los hongos con melanina de tipo dihidroxinaftaleno presentan una coloración marrón al ser tratados con triciclazol, que revierte al color negro original al eliminar el triciclazol del medio de cultivo. En otros hongos como los basidiomicetos o los zigomicetos no se ha encontrado la existencia de melanina de tipo dihidroxinaftaleno.

Las funciones fisiológicas de las melaninas fúngicas están todavía en fase de investigación y dependen del nicho ecológico de los hongos. Las melaninas protegen a los hongos frente a los cambios del medio ambiente y al estrés microbiológico. La habilidad de estos hongos, entre los que se incluye *S. prolificans*, de producir melanina puede ser un factor añadido de virulencia y patogenicidad, aunque esta hipótesis aún no está totalmente comprobada en el caso de los patógenos humanos (Vartivarian, 1992; Perfect y Schell, 1996). La melanina dihidroxinaftaleno ha resultado ser un importante factor de virulencia y patogenicidad en algunos hongos patógenos de plantas, como *Magnaphorte grisea* (Polak y Dixon, 1989); sin embargo, para otros como *Alternaria alternata* no constituye un factor de patogenicidad (Kawamura *et al.*, 1999). En algunos hongos dematiáceos patógenos como *Wangiella dermatitidis* la melanina puede ser un factor de virulencia, pero sin embargo no confiere una resistencia especial frente a los antifúngicos, al menos *in vitro* (Polak y Dixon, 1989). Recientemente se ha demostrado que este tipo de melanina también puede ser un factor de virulencia en el hongo patógeno humano no dematiáceo *Aspergillus fumigatus* (Jahn *et al.*, 1997).

Las melaninas pueden influir en el almacenamiento de agua e iones y producir resistencia a las enzimas líticas y a las radiaciones originadas por la luz solar, incluida la UV (Kawamura *et al.*, 1999). El grado de protección que confieren es proporcional a la concentración de melanina en las paredes de las conidias. Además, se caracterizan por sus propiedades antioxidantes. La obtención de cepas deficientes en melanina o albinas es relativamente fácil en muchos hongos dematiáceos, vía irradiación con luz UV o por agentes mutagénicos químicos (Jahn *et al.*, 1997; Torres-Guerrero y Arenas-López, 1998). También se pueden establecer sistemas para la búsqueda de productos químicos que inhiban la síntesis de melanina fúngica. Estos inhibidores pueden reducir la virulencia o disminuir la resistencia a anfotericina B o a otros antifúngicos.

4.4. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

La velocidad a la que el hongo se desarrolla ayuda directamente a su crecimiento y posterior diseminación en el tejido humano.

4.5. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Aunque no constituye un factor típico de virulencia, la resistencia intrínseca de *S. prolificans* a anfotericina B (Cuenca-Estrella *et al.*, 1999) lo convierte en un hongo

especialmente virulento que no responde a ningún tipo de tratamiento; esta resistencia se va a analizar con detalle a lo largo de esta Memoria.

Determinados factores de virulencia de los hongos son “un accidente de la naturaleza” y, por lo tanto, el resultado de su adaptación a la supervivencia como saprofitos o patógenos de plantas. No obstante, algunos de estos factores, como la termotolerancia, no desempeñan ninguna función obvia en el ciclo saprofítico de los hongos y parecen haber evolucionado como consecuencia de la colonización o infección de animales de sangre caliente. Existen además otros factores de virulencia putativos como la adherencia, la producción de toxinas, la secreción de enzimas y la adquisición de metales (Vartivarian, 1992).

Hasta el momento no ha sido definido ningún factor de virulencia de *S. prolificans*. Su resistencia intrínseca podría favorecer la colonización/infección frente a la presión selectiva de los antifúngicos en el medio hospitalario. *S. prolificans* no necesita un hospedador humano para completar su ciclo vital; es un hongo saprófito que se convierte en patógeno oportunista en determinadas ocasiones (Introducción 1; Berenguer *et al.*, 1997). No se conoce nada de los mecanismos de defensa humores y celulares que son necesarios para destruir las conidias de *S. prolificans*. No obstante, considerar a *S. prolificans* como un hongo saprofito estricto es un punto de vista muy simple, y no se puede descartar que por lo menos algún factor de virulencia haya evolucionado como una adaptación para infectar a humanos.

El experimento ideal para verificar la existencia de un factor de virulencia consiste en comparar la respuesta biológica del hongo en presencia y ausencia de dicho factor. Estas comparaciones requieren el aislamiento de cepas mutantes bien de manera natural o mediante mutagénesis inducida (Introducción 6). En otro sentido, los avances de la biología molecular fúngica han comenzado a hacer posible el clonaje de los genes responsables de los factores de virulencia putativos, así como su interrupción o bloqueo mediante transformación en el hongo a estudiar, o bien su expresión en otro organismo (Introducción 6). Por consiguiente, mientras que ha habido grandes avances en la identificación de los factores de virulencia para determinados hongos patógenos, en muchos otros (entre los que se incluye a *S. prolificans*) permanecen aún inéditos debido a la ausencia de técnicas moleculares aplicadas a su estudio.

5. METODOS DE TIPIFICADO DE MICROORGANISMOS

5.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Los esquemas de tipificado de microorganismos basados en análisis fenotípicos o genotípicos de aislados múltiples dentro de una especie en particular, permiten clasificar las cepas en grupos más pequeños. Este tipo de análisis tiene varias utilidades:

- a) Investigar brotes de infecciones nosocomiales.
- b) Examinar aislados secuenciales del mismo enfermo para determinar si la infección es recurrente o el paciente ha sufrido una reinfección.
- c) Determinar si ciertas cepas están asociadas con síndromes clínicos específicos y, por lo tanto, si tienen mecanismos de patogenicidad inusuales.

En un sentido más amplio, los métodos de tipificado también son adecuados para ampliar el conocimiento de la epidemiología de la infección.

Para evaluar cualquier sistema de tipificado deben ser considerados varios criterios (Power, 1996). Los más importantes son:

- Tipificabilidad, o la habilidad de la técnica de lograr un resultado interpretable con cada aislado y que éste sea definitivo.
- Discriminación, o la facultad de distinguir entre cepas no relacionadas epidemiológicamente.
- Reproducibilidad, o la capacidad del sistema de producir el mismo resultado cuando una misma cepa es aislada en múltiples ocasiones.

En adición a estos criterios mayores, cualquier sistema putativo de tipificado debe ser relativamente fácil de realizar, rápido, barato y emplear equipos accesibles. El sistema ideal debería tener una amplia aplicabilidad, permitiendo su empleo con un rango extenso de especies y géneros.

Los esquemas tradicionales de tipificado, basados en características fenotípicas, están limitados por el número restringido de caracteres que pueden ser examinados y por las alteraciones variables en su expresión genética. Además, estos métodos son a menudo dilatados de ejecutar y difíciles de interpretar. En términos generales, analizan aspectos bioquímicos, fisiológicos, morfológicos, macromoleculares y relativos a la sensibilidad a antimicrobianos. La mayor crítica que se les puede hacer es su falta de reproducibilidad debida a las alteraciones en su expresión. En muchos casos también son criticables la discriminación insuficiente para hacer estudios epidemiológicos y la no tipificabilidad de

muchos aislados. Estas limitaciones inherentes a los métodos tradicionales que detectan características fenotípicas (Kerr, 1994), han estimulado el desarrollo de técnicas basadas en la detección y análisis de ácidos nucleicos: los llamados métodos genotípicos.

Los métodos genotípicos más empleados para la caracterización molecular de hongos filamentosos se basan en la detección de polimorfismos en el tamaño de fragmentos de restricción (RFLPs), polimorfismos en el tamaño de los cromosomas (CLPs) o cariotipado, y polimorfismos en el tamaño de fragmentos amplificados por PCR (AFLPs). Dichos métodos han sido aplicados, sobre todo, al estudio de la epidemiología molecular de *Aspergillus* (Birch *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1999), aunque también se han empleado con otras especies de hongos filamentosos (MacNeil *et al.*, 1995).

La detección de RFLPs puede ser directa o indirecta. En la directa, tras la digestión total del DNA con endonucleasas, se analizan, en geles de agarosa, los patrones de restricción obtenidos (Birch *et al.*, 1995; MacNeil *et al.*, 1995). Los métodos indirectos para el análisis de RFLPs se basan en la hibridación del DNA digerido con sondas basadas en secuencias específicas, medianamente repetidas y dispersas en el genoma, como las empleadas con *Aspergillus fumigatus* (Girardin *et al.*, 1993; Birch *et al.*, 1995) y *Aspergillus nidulans* (Spreadbury *et al.*, 1990; Birch *et al.*, 1995). En este segundo caso las sondas son secuencias del rDNA. También se usan oligonucleótidos sintéticos complementarios a ciertas secuencias cortas conocidas como mini- o microsatélites, repetidas en *tandem* y dispersas en el genoma de los eucariotas (Vassart *et al.*, 1987). En este caso las sondas, al ser universales, presentan una mayor aplicabilidad para tipificar hongos filamentosos (Meyer *et al.*, 1991; MacNeil *et al.*, 1995). El análisis de RFLPs es muy discriminatorio pero constituye una técnica muy laboriosa. Se requieren grandes cantidades de DNA y, entre la digestión, electroforesis, hibridación y detección, se necesitan, al menos, 5 días para analizar un número limitado de cepas. Además, hay que asegurarse de que la enzima de restricción ha actuado correctamente, para no obtener falsos polimorfismos (Taylor *et al.*, 1999).

Para el análisis de CLPs es necesario separar los cromosomas de cada cepa en un gel de agarosa, mediante la aplicación de campos eléctricos que alternen su orientación. La identificación a nivel subespecífico ha sido lograda con algunas especies de hongos filamentosos, como *A. nidulans* (Geiser *et al.*, 1996) y el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii* (Tateishi *et al.*, 1996). Esta técnica es, en general, poco empleada para la caracterización subespecífica de hongos filamentosos (MacNeil *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1999). La preparación de la muestra para el cariotipado es muy difícil. Esto se debe a dos

factores: la naturaleza de las paredes celulares de los hongos y la necesidad de obtener DNA intacto de elevado peso molecular.

Hasta el momento no se han aplicado ninguno de los métodos descritos para tipificar poblaciones de *S. prolificans*.

En general, no existe un criterio único para analizar los patrones electroforéticos producidos por los métodos genotípicos. Los aislados se consideran idénticos cuando comparten todas las bandas; pero no existe un consenso en cuanto a lo que constituye un patrón o cepa diferente. Este hecho tan importante hace que, en cualquier estudio a realizar, haya que definir el criterio establecido para la comparación de los patrones de DNA obtenidos (Pfaller, 1995).

5.2. POLIMORFISMOS EN EL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR (AFLP)

Estos sistemas se han desarrollado con la intención de combinar las ventajas de los métodos genotípicos convencionales con los beneficios asociados a la PCR. En comparación con los otros métodos, las técnicas de PCR son, en general, simples, rápidas y requieren menos cantidad de DNA por análisis. A continuación se describen los métodos más comunes de tipificado de hongos basados en la PCR.

5.2.1. Perfiles arbitrarios múltiples de los amplificados (MAAP)

Los perfiles arbitrarios múltiples de los amplificados ("multiple arbitrary amplicon profiling" o MAAP) engloban a varias técnicas muy relacionadas (Kerr, 1994). Estas son: "arbitrarily primed PCR" (AP-PCR) (Welsh y McClelland, 1990), "direct amplification fingerprinting" (DAF) (Bassam *et al.*, 1992) y "random amplification of polymorphic DNA" (RAPD) (Williams *et al.*, 1993). Estos métodos amplifican el DNA con un solo iniciador de secuencia arbitraria.

La PCR se lleva a cabo en condiciones poco estrictas, es decir, baja temperatura de acoplamiento. Así, al comenzar la reacción, el iniciador se acopla a muchas secuencias del DNA molde. A continuación se produce el anclaje de la enzima y la extensión del iniciador. En los primeros ciclos de reacción se amplifican muchas secuencias debido a la eficiencia del acoplamiento del iniciador, y a la del proceso de extensión. En los primeros ciclos predominan las secuencias que se acoplan más eficientemente al DNA molde y en

los últimos lo hacen aquellas que resultan de la polimerización de los productos que se amplificaron en primer lugar. De los múltiples productos de amplificación resultantes, algunos son polimórficos, lo que permite la identificación de diferencias entre cepas de una misma especie. Los polimorfismos pueden presentarse en la longitud de los fragmentos y en la presencia o ausencia de los mismos. Estos polimorfismos pueden deberse a deleciones de los sitios de unión del iniciador, inserciones y deleciones entre los sitios de unión y cambios únicos de nucleótidos que causen malos emparejamientos en los sitios de unión. Las variaciones de intensidad entre los fragmentos de diferentes muestras son muy difíciles de evaluar y pueden deberse a un distinto número de copias de las secuencias amplificadas.

La mayor ventaja de este método es que no se necesita ninguna información previa del genoma que se quiere estudiar, lo cual permite su aplicación a cualquier especie.

La crítica más importante que se hace a este conjunto de técnicas es la alta sensibilidad de los resultados a ligeros cambios en las condiciones de reacción, lo que crea problemas de reproducibilidad en el tiempo. Un gran número de factores puede influir en el resultado de estas técnicas y antes de realizar una nueva aplicación hay que estandarizarlas rigurosamente (Kerr, 1994; Power, 1996). Por ejemplo, el DNA a emplear debe estar purificado (Yoon *et al.*, 1993). Los procedimientos, una vez estandarizados, deben seguirse escrupulosamente, ya que cambios aparentemente minúsculos (por ejemplo, el cambio de polimerasa o de termociclador) afectan profundamente a los perfiles electroforéticos (Kerr, 1994; Power, 1996).

Las distintas técnicas de MAAP antes mencionadas, son esencialmente similares. Difieren en la longitud de los iniciadores empleados, el rigor de las condiciones de reacción y los métodos usados para resolver y detectar los productos de amplificación. La técnica de RAPD (Williams *et al.*, 1993) es la más sencilla, y por lo tanto, es la más empleada. Utiliza iniciadores cortos, típicamente de 10 nucleótidos de longitud, y con un alto contenido de G+C. Los amplificados se separan en geles de agarosa, y se observan, bajo la luz UV, tras teñirlos con bromuro de etidio.

La técnica de RAPD es también la más utilizada para tipificar poblaciones de hongos filamentosos (MacNeil *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1999). Ello se debe, probablemente, a la rapidez, a que no es necesario conocer el genoma, a la poca cantidad de DNA necesaria para su ejecución y a la gran simplicidad para procesar los amplificados. Ha sido empleada para caracterizar brotes de infecciones nosocomiales causadas por *Aspergillus* (Birch *et al.*, 1995), especialmente *A. fumigatus* y *A. flavus*.

(Taylor *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; Pfaller, 1995). Se ha demostrado que el análisis por ordenador de los polimorfismos producidos por los RAPDs en *A. fumigatus* no es factible, ya que la distancia entre los fragmentos obtenidos es demasiado restringida (Latgé *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1999). Esta técnica también se ha utilizado con otras especies de hongos filamentosos o dimórficos como, por ejemplo, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum* (Howell *et al.*, 1999), *Fusarium solani* (Crowhurst *et al.*, 1991), *Leptosphaeria maculans* (Goodwin y Annis, 1991), *Coccidioides immitis* (Taylor *et al.*, 1999), *Histoplasma capsulatum* (Taylor *et al.*, 1999) y *Exophiala dermatitidis* (Rath *et al.*, 1997).

5.2.2. "PCR-fingerprinting"

Este método está basado en la presencia de secuencias cortas, repetidas e hipervariables en el genoma de todos los eucariotas (Vassart *et al.*, 1987). Dichas secuencias reciben el nombre de minisatélites (entre 15-100 nucleótidos) o microsatélites (unidades de 2-4 nucleótidos). Estas secuencias sencillas del DNA se conservan en secuencia pero no lo hacen en su frecuencia de repetición en el genoma, presentándose, a menudo, como un número variable de repeticiones en *tandem*. En la técnica de "PCR-fingerprinting" se utilizan como iniciadores únicos en una reacción de PCR. Así, si los mini o microsatélites se encuentran repetidos de manera inversa a una distancia amplificable, el iniciador se acoplará a dichas secuencias y la región genómica comprendida entre ellos se amplificará. La separación de los productos de reacción en un gel de agarosa, seguida de la tinción con bromuro de etidio, permite la diferenciación subespecífica. El que cada individuo de una especie pueda ser distinguido, hace que a esta técnica se le denomine "fingerprinting" o huella dactilar.

Los mini/microsatélites representan un conjunto óptimo de marcadores moleculares. Son polimórficos entre poblaciones, muy abundantes y están muy dispersos a lo largo de todo el genoma de los eucariotas. Además su empleo resulta técnicamente fácil y rápido en estudios de tipificación (Weising *et al.*, 1995).

En comparación con los RAPDs, la ventaja de esta técnica reside en la posibilidad de emplear condiciones más estrictas para el acoplamiento del iniciador con la secuencia diana, lo cual conlleva una mayor reproducibilidad de los patrones (Weising *et al.* 1995; Taylor *et al.*, 1999). Además, con cada reacción se producen muchos más fragmentos que con el análisis mediante RFLPs (Taylor *et al.*, 1999).

La mayor desventaja es que se necesita un conocimiento previo de la secuencia a la que se quiere dirigir el iniciador. Igualmente, pueden presentarse en el gel un pequeño número de fragmentos debidos a malos emparejamientos del iniciador (permitidos por la enzima *Taq*) durante los primeros ciclos de la PCR (Weising *et al.*, 1995). Esto daría lugar a patrones menos reproducibles, semejantes a los que aparecen en los RAPDs. Por este motivo, es recomendable realizar la reacción de PCR en las condiciones de temperatura de acoplamiento más altas posibles que permita el iniciador a emplear.

Uno de estos iniciadores es complementario a la región central del bacteriófago M13, y en un principio se usó como sonda de hibridación para detectar minisatélites hipervariables en el DNA humano y animal (Vassart *et al.*, 1987). En cuanto a su aplicación al reino de los hongos, inicialmente se empleó como sonda de hibridación para caracterizar subespecíficamente diversos hongos filamentosos (Meyer *et al.*, 1991). Su primera utilización para detectar polimorfismos por PCR fue en estudios de variabilidad genética de aislados clínicos y ambientales de *Cryptococcus neoformans* (Meyer *et al.*, 1993). Posteriormente se empleó en estudios de epidemiología molecular de *Candida albicans* (Berenguer *et al.*, 1996). Finalmente, se utilizó con diferentes hongos filamentosos como, por ejemplo, *Penicillium*, *Trichoderma* y el patógeno de plantas *Leptosphaeria maculans* (Meyer *et al.*, 1993; Kuhls *et al.*, 1996). Otros iniciadores son complementarios a secuencias simples y repetidas del DNA (microsatélites): (CA)_n, (CT)₈, (CTG)₅, (GACA)₄ y (GATA)₄. (CA)_n ha sido empleado recientemente para tipificar *A. fumigatus* (Bart-Delabesse *et al.*, 1998). Se ha descrito que los iniciadores M13, (GTG)₅ y (GACA)₄ son los más adecuados para la generación de fragmentos polimórficos e hipervariables de todas las especies fúngicas analizadas (Mitchell *et al.*, 1994). En definitiva, se ha demostrado que la técnica de “PCR-fingerprinting” puede ser aplicada a numerosas especies fúngicas (Meyer *et al.*, 1993).

5.3. METODOS DE TIPIFICACION DE *S. prolificans*

Como ya se ha mencionado en otros apartados de la introducción de esta Memoria, se conoce muy poco de la epidemiología, modo de transmisión o patogénesis de las infecciones producidas por *S. prolificans*. El empleo de técnicas moleculares para su análisis puede constituir una gran ayuda.

Hasta la fecha se han desarrollado dos métodos de tipificado, basados en el análisis del DNA, para caracterizar subespecíficamente cepas de *S. prolificans*. Estos son la

técnica de RAPD (Ruiz-Díez *et al.*, 1997; esta Memoria; San Millán *et al.*, 1997) y la de “PCR-fingerprinting” (Ruiz-Díez *et al.*, 1997; esta Memoria). El poder discriminatorio de estas técnicas es similar (Ruiz-Díez *et al.*, 1997; esta Memoria).

La técnica de RAPD se ha ensayado con distintos iniciadores y condiciones (Ruiz-Díez *et al.*, 1997; esta Memoria; San Millán *et al.*, 1997). En el trabajo de San Millán *et al.* (1997) se expone la necesidad de emplear al menos tres iniciadores para lograr un buen sistema de caracterización de cepas de *S. proliferans*. Con el empleo de un sólo iniciador no se consigue distinguir cepas de diferentes orígenes geográficos. Además, los autores realizan el análisis de los patrones visualmente y por ordenador. Aunque indican que es más discriminatorio el análisis visual, no encuentran muchas diferencias con uno u otro análisis. En este mismo trabajo también se encontró el mismo genotipo al analizar cepas secuenciales de un mismo paciente.

Para distinguir cepas de *S. proliferans* mediante “PCR-fingerprinting” se ha empleado como iniciador único la secuencia central del fago M13 (Ruiz-Díez *et al.*, 1997; esta Memoria).

6. INTRODUCCION A LA GENETICA FUNGICA

6.1. AISLAMIENTO DE MUTANTES

El aislamiento de mutantes es requerido por dos razones fundamentales; primero, como marcadores en análisis genéticos, y, segundo, como unas potentes herramientas para la investigación de procesos biológicos (Carlton y Brown, 1981). En los hongos, el análisis de mutantes que son defectuosos en diferentes partes del sistema bioquímico puede revelar detalles de la organización genética y bioquímica del hongo mutado. La elección del agente mutagénico es, sobre todo, una cuestión de conveniencia. La luz UV es probablemente el más adecuado para la gran mayoría de los propósitos de mutagénesis, y es fácil de utilizar, pero puede inducir aberraciones cromosómicas y mutaciones puntuales. Los mutágenos químicos deben ser empleados con mucho cuidado y pueden ser tan poderosos como para inducir mutaciones múltiples. Para comenzar el análisis genético de un organismo o carácter desconocido, cierta clase de mutantes inducidos pueden ser convenientes (Davis y De Serres, 1970). El color u otros marcadores visibles son muy valiosos en cualquier análisis genético, probablemente porque producen una indicación

inmediata de segregación (Jahn *et al.*, 1997; Torres-Guerrero y Arenas-López, 1998). Los mutantes resistentes a antimicrobianos son la segunda alternativa, porque, en teoría, son de fácil aislamiento. En tercer lugar se pueden seleccionar auxotrofías en virtud de su resistencia a antimetabolitos (Carlton y Brown, 1981).

Para empezar a trabajar con una estirpe salvaje hay que minimizar las dosis de mutagénesis e, incluso, comenzar por las mutaciones espontáneas (Davis y De Serres, 1970). Las frecuencias de mutación espontánea de genes nucleares son bajas y, por ello, los mutantes se suelen aislar más fácilmente tratando un cultivo con un agente mutagénico. Los mutágenos inducen generalmente las mutaciones a frecuencias de 10^{-5} a 10^{-3} por gen, que son mucho más altas que las frecuencias de mutación espontánea (10^{-8} a 10^{-6} por gen). Estas frecuencias suelen darse con caracteres dominantes en organismos diploides (o con recesivos/haploides). Si el organismo es diploide y la mutación es recesiva, las frecuencias serán más bajas: $>10^{-9}$ para mutaciones espontáneas y $>10^{-6}$ para mutaciones inducidas. El aislamiento de mutantes en hongos haploides es fácil, sin embargo constituye un gran problema en hongos diploides (Bos y Stadler, 1996).

El conocimiento del modo de actuación de algunos agentes mutagénicos ayuda a establecer correlaciones entre las acciones de dichos agentes y otros agentes físicos o químicos. En general, las mutaciones de resistencia a compuestos tóxicos suelen ser dominantes. Las mutaciones recesivas también se pueden inducir en cepas aneuploides, pero suelen ser inestables y revierten. Las mutaciones de resistencia se pueden adquirir en uno o en varios pasos (Bos y Stadler, 1996).

Una medida importante en el aislamiento de un mutante es su purificación. Esta consiste en un único paso en hongos, como *S. prolificans*, con esporas vegetativas uninucleares. Cuando un mutante se emplea como un método de análisis más que como un marcador genético, el paso crítico es la definición del mutante de interés. El método más productivo para el aislamiento de mutantes es a gran escala, para así obtener una buena idea del rango de fenotipos que se pueden analizar (Carlton y Brown, 1981).

6.2. TRANSFORMACION GENETICA DE HONGOS FILAMENTOSOS

Un factor esencial en el avance de las técnicas del DNA recombinante lo constituye el desarrollo de sistemas de transformación genética. La introducción del DNA exógeno en las células fúngicas suele realizarse mediante un sistema formado por un vector plasmídico que contiene un marcador que permite la selección de las células que han sido

transformadas con éxito (Fincham, 1989). Estos sistemas han hecho factible la manipulación del genoma de los hongos y, por lo tanto, correlacionar estudios *in vitro* empleando DNA purificado con las consecuencias biológicas *in vivo*. El desarrollo de un sistema de transformación genética para especies en las que no existe ninguno establecido puede conferir cambios significativos a su estudio en el ámbito molecular. La mejor estrategia consiste en recopilar los métodos que ya han sido aplicados con éxito a otras especies similares y determinar la mejor manera de aplicarlos al organismo objetivo del estudio. En cualquier caso, los pasos críticos en cualquier sistema de transformación son la técnica escogida y la elección de un marcador de selección efectivo. El desarrollo real de una estrategia dependerá de su objetivo final, de la disponibilidad del DNA transformante, de las barreras y dificultades presentadas por la cepa en particular, y de la fisiología y bioquímica del organismo diana.

El hongo filamentoso modelo en el que primero se desarrollaron técnicas de transformación genética fue *Neurospora crassa*, seguido de *Aspergillus nidulans* (Fincham, 1989). Casi todos los hongos pueden ser transformados, incluyendo los zigomicetos, ascomicetos y basidiomicetos, y también varios hongos imperfectos. La transformación es una parte esencial de la actual investigación con hongos y sus aplicaciones son muy importantes para muchas especies empleadas en biotecnología, al igual que para las especies patógenas del hombre o de plantas (Clutterbuck, 1995; Riach y Kinghorn, 1996; Kwon-Chung *et al.*, 1998).

6.2.1. Métodos de transformación

La preparación de protoplastos a partir de células fúngicas sigue siendo el método más común para transformar hongos (Riach y Kinghorn, 1996). En hongos filamentosos este tipo de transformación se ha realizado con diferentes tipos de células en distintas fases del crecimiento (microconidias y/o macroconidias germinadas y micelio joven). La elección de un tipo u otro de células parece ser una cuestión de conveniencia. *N. crassa* y distintas especies de *Aspergillus* han sido transformadas mediante diferentes métodos que emplean protoplastos (Fincham, 1989). Aunque se consigue una transformación eficiente utilizando protoplastos, su preparación requiere un control muy cuidadoso de cada paso y la optimización de las condiciones para cada lote de enzimas líticas en presencia de estabilizadores osmóticos (como por ejemplo sacarosa, sorbitol, cloruro sódico, etc.).

Además, en determinadas especies de hongos filamentosos, la digestión de la pared celular representa un problema prácticamente insalvable (Kwon-Chung *et al.*, 1998).

Algunos grupos han adoptado el empleo de altas concentraciones de cationes como el litio para permeabilizar la membrana, sin necesidad de formar protoplastos. Esta técnica sólo se ha utilizado con algunos hongos filamentosos como *N. crassa* y *Coprinus cinereus*, ya que estos cationes pueden resultar tóxicos para algunas especies (Fincham, 1989). Otro método de transformación que involucra células fúngicas intactas es el bombardeo de las esporas y/o hifas con partículas de tungsteno recubiertas del DNA (transformación biolística). Aunque es un procedimiento simple y factible para muchas especies de hongos filamentosos, no está extendido porque requiere unos equipos muy costosos y licencias especiales para su utilización (Riach y Kinghorn, 1996).

Habitualmente el transporte del DNA transformante requiere el tratamiento de los protoplastos con polietilenglicol en presencia de iones calcio, o el tratamiento de las esporas germinadas también con polietilenglicol pero en presencia de iones alcalinos (frecuentemente se emplea acetato de litio) (Fincham, 1989). Este DNA transformante puede encontrarse en forma lineal o circular, aunque los plásmidos circulares no sólo transforman peor, sino que, además, siempre se linearizan al entrar en las células (Kwon-Chung *et al.*, 1998).

Por último, la electroporación ha sido utilizada para la transformación de células animales, protoplastos de plantas, todo tipo de bacterias, levaduras y una gran variedad de hongos filamentosos (Chakraborty *et al.*, 1991). Esta técnica se basa en la permeabilización reversible de las membranas biológicas, inducida por campos eléctricos de corta duración y alta amplitud. Los cambios que ocurren en la membrana durante el pulso eléctrico permiten el transporte del DNA, cuya inmediata consecuencia es la transformación molecular. El desarrollo de sistemas de transformación en distintas especies de hongos filamentosos sólo ha sido posible con la introducción de la electroporación, y cada vez son más numerosos los trabajos en los que se describe su utilización. Básicamente, los métodos de electroporación de hongos filamentosos se pueden dividir en dos grupos. El primero de ellos realiza la electroporación directamente sobre esporas germinadas (Sánchez y Aguirre, 1996). El segundo electropora tubos germinales que han sido tratados durante un determinado período de tiempo con pequeñas cantidades de enzimas líticas (Chakraborty *et al.*, 1991; Ozeki *et al.*, 1994). Este segundo método ha sido empleado con más asiduidad para electroporar hongos filamentosos.

Entre los hongos filamentos transformados por electroporación encontramos a *N. crassa* (Chakraborty *et al.*, 1991), *Penicillium* sp. (Chakraborty *et al.*, 1991), *Wangiella dermatitidis* (Kwon-Chung *et al.*, 1998), *A. nidulans* (Sánchez y Aguirre, 1996), *A. niger* (Ozeki *et al.*, 1994), *A. oryzae* y *Leptosphaeria maculans* (Chakraborty *et al.*, 1991), etc. En particular, son numerosos los trabajos que presentan la electroporación de otros hongos patógenos de plantas.

6.2.2. Marcadores de selección

Actualmente se dispone de numerosos marcadores de selección dominantes para transformar una gran variedad de especies. En un principio, los marcadores para rutas biosintéticas eran los empleados con más asiduidad. De esta manera, ciertos genes salvajes que son capaces de complementar mutantes auxotróficos son muy útiles como marcadores de selección generales y han sido incorporados a vectores de clonaje. Un número determinado de estos genes es funcional en diferentes especies (Fincham, 1989). Las auxotrofías tienen el inconveniente de que requieren la generación de los genotipos apropiados en el organismo diana, lo que es difícil en aquellas especies en las que no se conoce su genoma.

Una alternativa es el empleo de genes que confieren resistencia a antimicrobianos (algunos de origen bacteriano). La ventaja de los genes de resistencia como marcadores de selección es que la cepa diana puede ser genéticamente de tipo salvaje, aunque su eficacia depende de la sensibilidad de la cepa al fungicida en particular, lo cual constituye un factor que puede variar enormemente. El gen bacteriano de resistencia a higromicina B (*hph*) acoplado a un promotor y a un terminador de la transcripción de *A. nidulans* (Punt *et al.*, 1987), ha sido aplicado para desarrollar sistemas de transformación en una gran variedad de hongos filamentosos (Clutterbuck, 1995). En realidad este marcador es el más empleado para transformar la gran mayoría de ellos: *Aspergillus* sp. (especies para las que fue diseñado por Punt y colaboradores), *N. crassa* (Chakraborty *et al.*, 1991), *Magnaporthe grisea* (An *et al.*, 1996), *Alternaria alternata* (Tsuge *et al.*, 1990), *Penicillium* sp. (Chakraborty *et al.*, 1991), *Trichoderma viride* (Manczinger *et al.*, 1997) y un largo etcétera. También se utiliza con numerosos hongos dimórficos como, por ejemplo, *Ustilago maydis* (An *et al.*, 1996), *Histoplasma capsulatum*, *Wangiella dermatitidis* y *Blastomyces dermatitidis* (Kwon-Chung *et al.*, 1998). Otros ejemplos de marcadores dominantes son el gen bacteriano de resistencia a fleomicina (Fincham, 1989),

el gen mutado de la β -tubulina de *N. crassa*, que confiere resistencia al benomilo (*Ben^r*) y el gen mutado de *A. niger* que proporciona resistencia a la oligomicina (*oliC*) (Clutterbuck, 1995).

6.2.3. Destinos del DNA transformante

El DNA transformante puede ser añadido a las células fúngicas de dos maneras (Fincham, 1989):

1. Ligado a un plásmido capaz de replicarse autónomamente en la cepa receptora.
2. Sin un origen de replicación fúngico, en cuyo caso el éxito de la transformación depende de la integración del DNA en los cromosomas.

6.2.3.1. Vectores de replicación autónomos

Uno de los principales objetivos de los sistemas de transformación en hongos es la generación de auténticos vectores de replicación autónoma basados en vectores bacterianos, para obtener mayores frecuencias de transformación y conseguir también su recuperación en *E. coli*.

En la levadura *S. cerevisiae* se encontró que la incorporación de secuencias autónomas de replicación (ARS) permitía la replicación del plásmido para producir transformantes inestables con alta frecuencia. La adición de secuencias de centrómeros a los vectores portadores de ARS, permitía el aislamiento de transformantes estables que contenían de 1 a 3 copias del plásmido. Las secuencias autónomas de replicación de levaduras están bien caracterizadas y los fragmentos de DNA con esta actividad pueden ser aislados de una gran variedad de orígenes (Fincham, 1989).

En los hongos filamentosos se han encontrado escasas secuencias autónomas de replicación y, por lo tanto, se han aplicado poco. Además no se han obtenido, hasta el momento, secuencias de centrómeros que permitan el empleo de vectores de replicación estables. El basidiomiceto *U. maydis* es un caso en el que sí se ha aislado una secuencia muy similar a las ARS de levaduras (Clutterbuck, 1995). Un origen aparente de replicación de *A. nidulans*, AMA1, da lugar aun número muy alto de transformantes inestables (con y sin selección) que contienen entre 5 y 10 copias del plásmido por genoma (Gems *et al.*, 1991). Las frecuencias de cotransformación con vectores portadores de la secuencia AMA1 y sin un marcador de selección son altas y proceden de la formación de cointegrados autónomos replicativos (Gems y Clutterbuck, 1993). Esta

secuencia es funcional en otros hongos filamentosos como *A. niger* y *A. oryzae*, *Gaeumannomyces graminis* y *Penicillium chrysogenum* (Riach y Kinghorn, 1996).

A pesar del ejemplo anteriormente citado de la secuencia de *A. nidulans*, habitualmente las ARS sólo funcionan con las especies de las que proceden (Gems y Clutterbuck, 1993). En aquellas especies cuyo genoma es desconocido, como *S. prolificans*, resulta difícil construir un vector lanzadera, y además, la probabilidad de que funcionen las ARS de otros hongos es bastante pequeña.

6.2.3.2. Transformación por integración del DNA en los cromosomas

En *S. cerevisiae* los plásmidos que llevan marcadores de selección se integran en el genoma por recombinación homóloga, produciendo transformaciones de baja frecuencia. Los primeros sistemas de transformación desarrollados con *N. crassa* y *A. nidulans* pronto demostraron que los plásmidos sólo se mantenían si se recombinaban con los cromosomas (Fincham, 1989). Las comparaciones con los plásmidos replicativos sugerían que éste era, a menudo, el paso limitante para la obtención de un gran número de transformantes. Los tres tipos de recombinación descritos para levaduras, también se han observado con hongos filamentosos (Clutterbuck, 1995; Riach y Kinghorn, 1996):

1. Integración homóloga aditiva: si un alelo mutante del marcador de selección existe en la cepa receptora, puede tener lugar un cruzamiento sencillo homólogo que da como resultado la integración del plásmido.
2. Reemplazamiento: alternativamente, puede producirse un intercambio de secuencias por cruzamiento doble o conversión génica, sin que se integre todo el plásmido.
3. Integración no homóloga o ectópica: no se modifica la secuencia del alelo receptor, pero el vector plasmídico se integra en otras partes del genoma y el sitio de integración varía de unos transformantes a otros. Se atribuye a cruzamientos sencillos entre el plásmido y sitios no homólogos del cromosoma.

En general, en los hongos filamentosos, a diferencia con las levaduras, la transformación se debe principalmente a integraciones ectópicas del DNA en el genoma, aunque también existen integraciones homólogas. Habitualmente es común encontrar integraciones múltiples en sitios homólogos y no homólogos. Las frecuencias relativas del número y del tipo de integraciones dependen del sistema de transformación y de la cepa empleada (Riach y Kinghorn, 1996). Por ejemplo, en *N. crassa* predominan las integraciones ectópicas, pero la proporción de recombinación homóloga puede ser aumentada si la región de homología es mayor. En *A. nidulans* las integraciones homóloga

y ectópica tienen una frecuencia similar y el sitio depende del marcador de selección que se emplee (Clutterbuck, 1995).

En los hongos filamentosos es muy frecuente hallar transformantes que posean más de una copia del vector (habitualmente son repeticiones en *tandem*). Este hecho se puede explicar de dos formas (Clutterbuck, 1995):

- a) Los plásmidos circulares pueden producir recombinación homóloga consigo mismos dando lugar a oligómeros antes de integrarse en el genoma.
- b) La integración se produce por un monómero, pero a continuación se produce una integración secundaria por más copias del plásmido que se integran por homología con la primera.

La integración del plásmido puede, en algunos casos, ir acompañada de reorganizaciones en la región adyacente de los cromosomas, quizás como una muestra de la inesperada complejidad del proceso de recombinación plásmido-cromosoma, o reflejando la recombinación preferente del plásmido con regiones cromosómicas que ya estaban “rotas”. En esta última hipótesis, el daño cromosómico bien puede ser la consecuencia de los sistemas de reparación del DNA que se han inducido por la presencia de DNA exógeno fragmentado (Clutterbuck, 1995).

Las frecuencias de transformación por integración en hongos filamentosos son habitualmente bajas (Riach y Kinghorn, 1996). A menudo sucede que en los primeros experimentos de transformación con una especie en particular, sólo se dispone para la selección de transformantes de genes clonados que proceden de otras especies. Los plásmidos que poseen marcadores de selección heterólogos son menos efectivos que aquellos que además portan genes de la especie en estudio (Clutterbuck, 1995). La identificación de un sistema de transformación genética que sea muy eficaz con su diana es inusual en hongos filamentosos, excepto en las especies “modelo” (Riach y Kinghorn, 1996). Una estrategia para aumentar la integración consiste en la creación de vectores específicos para cada especie de tal manera que porten genes o partes de genes homólogos. Por ejemplo, el rDNA se encuentra repetido en múltiples copias en el genoma de los eucariotas (Bruns *et al.*, 1991) lo que facilita *a priori* su recombinación. Esta táctica se empleó en primer lugar con levaduras. En los hongos filamentosos el papel de la longitud de la secuencia homóloga en la frecuencia de transformación no ha sido estudiado sistemáticamente. No obstante, esta estrategia se ha aplicado con éxito a algunos hongos filamentosos como *A. alternata* (Tsuge *et al.*, 1990; Shiotani y Tsuge, 1995) y el hongo industrial *Cephalosporium acremonium* (Skatrud *et al.*, 1987).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de técnicas moleculares específicas para el hongo patógeno humano *Scedosporium prolificans*, encaminadas a adquirir un mayor conocimiento de su taxonomía, variabilidad genética y patogenicidad, así como aportar alternativas al problema de su resistencia total a los antifúngicos. Este objetivo se concreta en los puntos siguientes.

1. Se estudiarían cepas de *S. prolificans* de diferente origen geográfico y clínico (de infecciones diseminadas y localizadas) y de origen ambiental. También se analizarían mutantes y cepas construidas en el laboratorio, y se compararían *S. prolificans* y *S. apiospermum* en relación con su taxonomía molecular y su respuesta a los antifúngicos.
2. Con objeto de situar filogenéticamente de forma más precisa a *S. prolificans* dentro de los hongos filamentosos se trataría de analizar los patrones de restricción y las secuencias de nucleótidos de regiones del DNA ribosómico con valor taxonómico, incluidos los espaciadores internos transcritos (ITSI e ITSII).
3. El estudio de la resistencia de *S. prolificans* a todos los antifúngicos, y en especial a la anfotericina B, se abordaría empleando diferentes técnicas que permitiesen medir no sólo su poder inhibitorio, sino también su capacidad fungicida y de producir daño celular. Con estas técnicas se buscarían combinaciones de antimicrobianos que resultasen sinérgicas sobre esta especie y que soslayasen la inactividad de los antifúngicos clásicos.
4. Dado que *S. prolificans* ha sido involucrado en diferentes brotes de infección nosocomial en España, se estudiarían algunas de estas cepas mediante métodos de tipificado molecular basados en la reacción en cadena de la polimerasa. Las técnicas de amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) y de amplificación con iniciadores únicos dirigidos a secuencias de minisatélites eucarióticos ("PCR-fingerprinting") serían puestas a punto y evaluadas en cuanto a su poder de discriminación para aplicarlas posteriormente a las cepas de un mismo hospital y analizar su diversidad.
5. Como introducción al análisis genético de *S. prolificans* se caracterizarían los fenotipos apropiados para el aislamiento de mutantes, tanto espontáneos como inducidos con luz UV, así como los marcadores de selección y los vectores que permitiesen desarrollar un sistema de transformación genética de esta especie.

MATERIALES

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. BACTERIAS Y BACTERIOFAGOS

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), supE44, relA1, λ-, lac-, [F', proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10(tet)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987
Fago ayudante M13K07	Derivado de M13mpl	Vieira y Messing, 1987

1.2. PLASMIDOS Y COSMIDOS

- pGemT (Promega). Está diseñado especialmente para el clonaje de productos de PCR.
- pMLF2. Amablemente proporcionado por la Dra. S. Leong. Es un vector general para hongos ascomicetos. Posee el gen de resistencia a higromicina B de *E. coli* con un promotor y terminador de *Aspergillus* sp. También contiene el gen de resistencia a ampicilina, así como el sitio *cos*, lo que le hace apto para construir genotecas genómicas. (An *et al.*, 1996).
- pSP1. Vector especial para *S. prolificans*. Construido a partir del vector pMLF2, por clonaje de la región ITS1-5,8S-ITSII de la cepa tipo de *S. prolificans* en el sitio *HindIII* de dicho vector (Resultados 5.2.2.).

1.3. HONGOS

Tabla 1. Cepas de *Scedosporium apiospermum*/ *Pseudallescheria boydii*.

Cepa	Origen	Localización geográfica	Fecha de aislamiento
<i>P. boydii</i> CBS 101.22 ^a	Micetoma	Estados Unidos	1980
<i>S. apiospermum</i> CNMM ^b 195	Biopsia pulmonar	Madrid	1992

^aCepa tipo (McGinnis *et al.*, 1982).

^b Centro Nacional de Microbiología/Miceliales.

Tabla 2. Cepas empleadas de *Scedosporium prolificans*.

	Origen	Localización geográfica (hospital)	Fecha de aislamiento
Cepas de referencia			
CBS 467.74 ^a	Ambiental	Bélgica (A)	1974
ATCC64913 ^b	Osteomelitis (Biopsia)	Canadá (B)	1984
NCPF2884	Hemocultivo	Madrid (C)	1992
Cepas caracterizadas a nivel subespecífico			
CNMM ^c 513	Líquido sinovial	Madrid (D)	15-2-94
CNMM 571	Hemocultivo	Madrid (E)	16-9-94
CNMM 89	Hemocultivo	San Sebastián (F)	17-2-92
CNMM 209	Espito	San Sebastián (F)	14-10-92
CNMM 222	Lavado broncoalveolar	San Sebastián (F)	27-10-92
CNMM 546	Hemocultivo	Baracaldo (G)	28-6-94
CNMM 611	Hemocultivo	Baracaldo (G)	16-2-95
CNMM 687	Espito	Vitoria (H)	6-11-95
CNMM 425	Hemocultivo	Barcelona (I)	18-8-93
CNMM 272	Hemocultivo	Oviedo (J)	7-1-93
CNMM 324	Hemocultivo	Oviedo (J)	7-1-93
CNMM 323	Hemocultivo	Oviedo(J)	7-1-93
CNMM 322	Hemocultivo	Oviedo(J)	7-1-93
CNMM 1016	Hemocultivo	La Coruña (K)	16-10-97
CNMM 1018	Herida de catéter	La Coruña (K)	16-10-97
CNMM 1034	Hemocultivo	La Coruña (K)	21-11-97
CNMM 1051	Hemocultivo	La Coruña (K)	4-12-97
CNMM 1056	Muestra ambiental	La Coruña (K)	29-12-97
CNMM 1073	Muestra ambiental	La Coruña (K)	17-2-98

^a Cepa tipo (Ghého y de Hoog, 1991).^b Cepa ex-tipo (Malloch y Salkin, 1984).^c Centro Nacional de Microbiología/Miceliales.

Tabla 3. Otras especies fúngicas.

Especie	Cepa	Utilidad	Referencia
<i>Paecilomyces variotii</i>	ATCC 22318	Control en las pruebas de sensibilidad a antifúngicos	Espinel-Ingroff <i>et al.</i> , 1995
<i>Neurospora crassa</i>	CECT 2258	Control de electroporación	Catálogo CECT

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. BACTERIANOS

Medio	Composición	Utilidad	Marca comercial
Caldo Lb	Bactotripton 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%	Cultivo general	Difco
Agar Lb	Caldo Lb + bacto-agar 1,5%	Cultivo general	Difco
SOB	Bactotripton 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0,05%, KCl 250 mM, MgCl ₂ 10 mM, pH 7,0	Cultivo general, extracción de DNA plasmídico	Difco, Merck
Medio ψ	Bactotripton 2%, extracto de levadura 0,5%, MgSO ₄ 0,4%, KCl 10 mM, pH 7,6	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	Difco, Merck
Caldo Typ	Bactotripton 1,6%, extracto de levadura 1,6%, NaCl 0,5%, K ₂ HPO ₄ 0,25%	Extracción de DNA de cadena sencilla	Difco, Merck

2.2. MICOLOGICOS

Medio	Composición	Utilidad	Marca Comercial
Caldo PD	Infusión de patatas 20%, bacto-dextrosa 2%, pH 5,1	Cultivo general	Difco
Agar PD (APD)	Caldo PD + bacto-agar 1,5%, pH 5,6	Cultivo general, pruebas de sensibilidad a antifúngicos	Difco
Caldo Sabouraud (Sab)	Polipeptona 1%, dextrosa 4%, pH 5,6	Extracción de DNA a pequeña escala	Oxoid
Agar Sabouraud (Sab)	Caldo Sab + bacto-agar 1,2%, pH 5,6	Cultivo general	Oxoid
GEPD	Glucosa 2%, extracto de levadura 0,3%, peptona 1%	Extracción de DNA a media escala	Merck, Difco
CM	Sacarosa 0,5%, extracto de levadura 0,6%, hidrolizado de caseína 0,6%.	Transformación de <i>S. proliferans</i>	Merck, Difco
RPMI-2% glucosa	RPMI 1640 con L-glutamina, MOPS 0,165 M, glucosa 2%, pH 7,0 con NaOH 10 M.	Pruebas de sensibilidad a antifúngicos	Sigma, Merck

3. PRODUCTOS Y REACTIVOS

3.1. ANTIMICROBIANOS

Sustancia	Diluyente	Casa comercial
Anfotericina B	Dimetilsulfóxido DMSO	Sigma
Nistatina	DMSO	Sigma
Fluconazol	DMSO	Pzifer
Itraconazol	DMSO	Janssen
Miconazol	DMSO	Janssen
Ketoconazol	DMSO	Janssen
5-Fluorocitosina	Agua destilada	Roche
Voriconazol	DMSO	Pfizer
Pneumocandina L-733-560	Agua destilada	Merck
Sordarina GW 471552A	DMSO	Glaxo
Higromicina B	Agua destilada	Sigma
Cicloheximida	Acetona	Sigma
Rifampicina	Metanol	Sigma
Minociclina	Agua destilada	Sigma
Tetraciclina	Etanol o agua destilada	Sigma
Nikomicina	DMSO	Sigma
Paromomicina	Agua destilada	Sigma
Eritromicina	Etanol	Sigma
Cloranfenicol	Etanol	Sigma
Gentamicina	Agua destilada	CEPA
Triciclazol	Etanol	Dow-Elanco
Cerulenina	Etanol	Sigma
Ampicilina	Agua destilada	Sigma
Kanamicina	Agua destilada	Sigma

La solución madre se prepara a una concentración 100 veces superior a la concentración de trabajo por ajuste del peso de acuerdo con la potencia del antimicrobiano. Se conserva a -70°C hasta su empleo.

3.2. ENZIMAS

Las enzimas empleadas en la purificación de ácidos nucleicos son: RNAsa A libre de DNAsa, de Pharmacia, y Proteinasa K, de Sigma. Las endonucleasas de restricción *HaeIII*, *HhaI*, *Apal*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *NcoI* y *NotI*, fueron suministradas por Pharmacia. La DNA ligasa de T4 se obtuvo de Promega, y la DNA polimerasa *Taq* (Amplitaq) de Perkin-Elmer. La DNA polimerasa de T7 y la fosfatasa alcalina de intestino de ternera fueron suministradas por Pharmacia.

Las enzimas líticas β -glucuronidasa y quitinasa fueron suministradas por Sigma y Fluka, respectivamente.

3.3. OLIGODESOXINUCLEOTIDOS

Los oligonucleótidos se han sintetizado en la Unidad de Biopolímeros del Instituto de Salud Carlos III. La síntesis se ha realizado mediante el método estándar de la fosforamidita con un aparato Gene Assembler (Pharmacia LKB) y reactivos suministrados por la misma casa comercial. En la tabla que se presenta a continuación, se detallan las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Los oligonucleótidos M13, ITS1H e ITS4H fueron adquiridos directamente a Pharmacia.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Utilización
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	PCR de rDNA
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	PCR de rDNA
ITS2	GCTGCGTTCATCGATGC	Secuenciación
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Secuenciación
ITS8	CAACCGTAGCGCCCAACAC	Secuenciación
ITS10	TCGCCGTAGCGCCCAACAC	Secuenciación
GC70	CGGCCACTGT	RAPD
GC80	CGGCCCTGT	RAPD
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	PCR-fingerprinting
ITS1H	GCAAGCTTTCCGTAGGTGAACCTGCGG	PCR de rDNA
ITS4H	GGAAGCTTTCCCTATTGATATGC	PCR de rDNA
1947-1965	GTCGAGAAGTTTCTGATCG	PCR del gen <i>hph</i>
2906-2885	GTTTCCACTGGCGAGTACT	PCR del gen <i>hph</i>

3.4. OTROS PRODUCTOS Y REACTIVOS QUIMICOS

Producto	Diluyente	Marca comercial
X-gal	Dimetilformamida	Sigma
IPTG	Agua destilada	Sigma
Dimetoxi-metilbenzoquinona (Coenzima Q)	Tampón fosfato	Sigma
XTT (Sal sódica de (2,3-bis-[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolil-5-carboxianilida))	Tampón fosfato	Sigma
Etanol absoluto		Merck

Isopropanol	Merck
Agarosa	Sigma
Agarosa de bajo punto de fusión Nusieve GTG	FMC
Fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)	Sigma
Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)	Merck

Tanto los reactivos como las soluciones comerciales empleadas cumplen las normas ISO y son de grado "biología molecular".

Marcadores de peso molecular de DNA: "100 Base-pair ladder" y "Kilobase DNA marker" de Pharmacia, fago lambda *Hind*III marcado con fluoresceína (Amersham).

4. TAMPONES Y SOLUCIONES

- Tampón fosfato: KCl 0,02%; KH_2PO_4 0,02%; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01%; NaCl 0,8%; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,216%.
- Tampón SE: citrato-fosfato 0,02 M pH 5,6; EDTA 0,05 M pH 8; sorbitol 0,9 M.
- Tampón de extracción de DNA de hongos filamentosos a pequeña escala: tris-HCl 0,05 M pH 7,2; EDTA 0,05 M pH 8; SDS 3%; β -mercaptoetanol 1%.
- Tampón de extracción de DNA de hongos filamentosos a media escala: tris-HCl 0,2 M pH 7,6; NaCl 0,5 M; EDTA 0,01 M pH 8; SDS 1%.
- Tampón TE: tris-HCl 0,01 M, pH 7,5; EDTA 0,001 M.
- Tampón TAE: tris-acetato 0,04 M; EDTA 0,001 M.
- Tampón TBE: tris-borato 0,09 M; EDTA 0,02 M.
- Tampón de carga (tipo II): azul de bromofenol 0,25%; xilenecianol 0,25%; ficoll 15%.
- Tampón de electroporación: manitol 0,05 M; hepes 0,001 M pH 7,5.
- Tampón SSC x20: citrato trisódico 0,3 M; NaCl 3 M, pH 7,0.
- Tampón de hibridación: SSC x5; agente bloqueante 0,5% (Amersham); SDS 1%; sulfato de dextrano 5%.
- Solución de lavado I: SSC x1; SDS 0,1%.
- Solución de lavado II: SSC x0,5; SDS 0,1%.

El resto de las soluciones empleadas son las de uso común en un laboratorio de Biología Molecular.

METODOS

1. MICOLOGIA

1.1. CULTIVO DE HONGOS FILAMENTOSOS EN MEDIO SOLIDO

Los hongos filamentosos se cultivan en placas o tubos con medio de cultivo sólido a 28°C, durante el tiempo suficiente para evaluar el crecimiento (habitualmente, durante 1-2 semanas) (Sutton *et al.*, 1998). El hongo se recoge con una aguja de inoculación y se deposita sobre el medio de cultivo sólido.

1.2. OBTENCION DE ESPORAS A PEQUEÑA ESCALA

Se cultiva la cepa en un tubo con APD, durante 7-10 días a 35°C, para inducir la esporulación. Se cubre la colonia con 1-2 ml de agua destilada estéril y se raspa la superficie con la punta de una pipeta Pasteur estéril. De esta forma se obtiene una suspensión turbia, formada por esporas y trozos de hifas, que se transfiere a otro tubo estéril. Se espera un tiempo prudencial (3-5 min) para que las partículas más densas sedimenten. La parte superior de la suspensión homogénea se transfiere a otro tubo. Esta suspensión de esporas se puede utilizar directamente, haciendo diluciones y contando el número de esporas por ml. También se puede ajustar con un espectrofotómetro para tubos, a una longitud de onda de 530 nm, a la absorbancia que se desee y así obtener un inóculo estandarizado. La Tabla 5 muestra los recuentos de UFC que se obtienen con un rango de valores de absorbancia (530 nm). Así se obtienen hasta 10^7 esporas/ml de *S. prolificans*.

Tabla 5. Recuento de UFC/ml en función de la A_{530} en el caso de *S. prolificans* NCPF 2884

A_{530}	UFC/ml ($\times 10^6$)
0,17	1,5
0,20	1,5
0,30	1,5
0,40	3
0,50	3
0,60	3,7
0,70	5
0,80	6-7
0,90	7-13
1,0	13-18
2,0	18-25
2,5	25-29

1.3. CULTIVO DE HONGOS FILAMENTOSOS EN MEDIO LIQUIDO

Para crecer los hongos filamentosos en medio líquido, siempre se parte de una suspensión de esporas. Se inocula una determinada concentración de esporas en frascos de vidrio que contienen el medio de cultivo necesario para cada tipo de experimento. El cultivo se deja crecer a 30-35°C, con agitación.

1.4. OBTENCION DE ESPORAS A GRAN ESCALA

Este método se emplea cuando se quieren conseguir más de 10^7 esporas/ml. Se prepara una suspensión de esporas a pequeña escala en agua destilada. A continuación se inocula 1 ml de dicha suspensión en un frasco de vidrio de 1000 ml que contiene 100 ml de medio PD líquido. Se deja crecer a 28°C y 150 rpm durante 10-11 días, con el tapón aflojado. Al cabo de este tiempo se filtra el cultivo, a través de un filtro de 11 μm estéril. Si se quieren obtener las esporas sin el medio de cultivo, se realiza una segunda filtración por un filtro, también estéril, de 0,45 μm . En el filtro obtenemos las esporas que podemos resuspender en el medio y volumen que se desee.

Con este procedimiento, en 11 días de incubación y con un volumen final de 5 ml de agua destilada, se obtienen $1\text{-}3\cdot 10^9$ esporas/ml de *S. prolificans*.

1.5. CONSERVACION DE HONGOS FILAMENTOSOS

La cepa objeto de estudio se siembra en un tubo con agar Sab inclinado y se incuba a 28-30°C, durante 10-12 días. A partir de este cultivo, se prepara una suspensión de esporas y se siembran diferentes diluciones en placas con agar Sab con el fin de obtener colonias aisladas (30°C, 3-4 días). Una sola colonia se pasa a un tubo con APD y se deja crecer a 30°C hasta que esporule bien.

Este cultivo obtenido a partir de una espora, se observa macroscópica y microscópicamente. Una vez comprobada la identidad, se conserva la cepa de las siguientes formas:

- a) A 4°C, suspensiones de esporas en agua destilada
- b) A 4°C, -20°C y -70°C en tubos con agar Sab.

1.6. IDENTIFICACION FENOTIPICA

Se parte de una cepa crecida en APD. En primer lugar se efectúa un examen macroscópico, que consiste en valorar la velocidad de crecimiento del hongo, aspecto, forma y coloración gris-verdosa del anverso y reverso de la colonia (Sutton *et al.*, 1998). Para evaluar la velocidad de crecimiento se siembra el hongo en un punto pinchando con aguja en el agar, y se mide el diámetro de la colonia a los 10 días, lo cual permite clasificar a *S. prolificans* como de crecimiento moderado (Sutton *et al.*, 1998), ya que su diámetro está entre 45-50 cm (30°C, agar Sab).

A continuación se realiza un examen microscópico, con azul de lactofenol o lactofucsina, en un portaobjetos limpio. La recogida del hongo se hace con aguja de inoculación. La preparación se examina al microscopio con objetivos de x10, x20, x40 y x100 aumentos. Las cepas de *S. prolificans* se identifican por la presencia de grupos húmedos de aneloconidias en el ápice de anérides con bases hinchadas (Sutton *et al.*, 1998).

En las ocasiones en que no se puede identificar con claridad una cepa mediante los métodos descritos, es necesario preparar un microcultivo según la técnica de referencia (Sutton *et al.*, 1998).

2. SENSIBILIDAD A ANTIFUNGICOS

En la presente memoria se han empleado diferentes métodos para analizar la sensibilidad a antifúngicos de *S. prolificans*.

2.1. PREPARACION DEL INOCULO

Tras obtener una preparación de esporas a pequeña escala (Métodos 1.2.), la suspensión se agita en un agitubos durante 15 s y se ajusta a una absorbancia de 0,15-0,17 con un espectrofotómetro para tubos (Spectronic) a $\lambda=530$ nm. Esto produce un inóculo equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/ml (Tabla 5, Métodos 1.2.). El número de UFC/ml se verifica periódicamente, haciendo diluciones y sembrando en APD.

2.2. CALCULO DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI)

Los métodos de dilución en medio líquido que se describen a continuación (apartados 2.2.1. y 2.2.2.) están basados en las técnicas normalizadas del NCCLS para hongos filamentosos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998).

2.2.1. Técnica de microdilución

Se ha seguido el método descrito por Espinel Ingroff *et al.* (1995), con pequeñas modificaciones.

Se preparan placas de microdilución estériles de 96 pocillos con fondo plano, con tapa de plástico rígido. Se diluyen las soluciones madre de cada antifúngico con RPMI-2% glucosa para alcanzar las concentraciones de trabajo más altas, a partir de las cuales se hacen diluciones dobles seriadas, en un volumen final de 100 μ l, para conseguir los intervalos de concentración adecuados en cada caso. Las placas contienen dos columnas sin antifúngico: una para el control de crecimiento y otra para el de esterilidad.

Se inoculan 10 μ l por pocillo de la placa de microdilución (inóculo final 10^5 UFC/ml), excepto en la columna que sirve como control de esterilidad. En todas las placas se incluye la cepa control de *P. variotii* (Tabla 3 de Materiales 1.3.).

Las placas inoculadas se incuban a 35°C, durante tres días, con humedad para prevenir la evaporación, pero sin impedir la entrada de aire.

La lectura se realiza a las 24, 48 y 72 h de forma visual. La CMI se define como la concentración más baja de antifúngico que inhibe por completo el crecimiento fúngico.

En determinados casos en los que se emplean mutantes que presentan poca o ninguna esporulación, la sensibilidad se determina inoculando cada pocillo con hifas en lugar de esporas. En estos experimentos se incluye siempre como control, además de la cepa control de *P. variotii*, la cepa tipo de *S. prolificans* (Tabla 2, Materiales 1.3.). El único antifúngico evaluado de tal manera es la anfotericina B.

2.2.2. Técnica de macrodilución

Se ha seguido el método descrito por Espinel Ingroff *et al.* (1995), con modificaciones.

Las pruebas de sensibilidad por macrodilución se hacen en tubos estériles de poliestireno, con fondo cónico y tapón a rosca. La solución madre del antimicrobiano se diluye a una concentración de 1 mg/ml (10 veces la concentración más alta de trabajo) con RPMI-2% glucosa. A partir de esta nueva solución madre se realizan diluciones seriadas 1:10 empleando el medio de cultivo como diluyente y en un volumen final de 1 ml. Siempre se incluye un tubo como control de esterilidad y otro sin antimicrobiano como control de crecimiento.

Se añaden 100 µl de inóculo a cada tubo (inóculo final: 10^5 UFC/ml). Como control se incluye siempre la cepa tipo de *S. proliferans*. También se inocula la cepa control a un tubo que contiene el medio de cultivo con el disolvente del antimicrobiano, para asegurarse de que el disolvente no afecta al crecimiento fúngico.

Los tubos se incuban a 35°C, durante 1-4 días, con los tapones aflojados para facilitar el acceso del aire. Antes de realizar la lectura se agitan bien, con el objeto de detectar hasta el más pequeño crecimiento. La primera lectura se realiza cuando el control de crecimiento presenta turbidez. La CMI se define como la concentración más baja de antifúngico que inhibe por completo el crecimiento fúngico, determinado visualmente, a los 3 días de cultivo, siempre y cuando el control de crecimiento sin antifúngico haya alcanzado el máximo crecimiento.

2.2.3. Técnica de dilución en agar

La sensibilidad a antimicrobianos mediante la técnica de dilución en agar sólo se ha determinado con la cepa tipo de *S. proliferans*.

Para ello, se diluye la solución madre de antimicrobiano en agua destilada a una concentración diez veces superior a la concentración de trabajo más alta (suele ser 2000 µg/ml). A partir de esta solución se van efectuando diluciones seriadas dobles, también en agua destilada. A continuación se mezclan 2 ml de cada dilución con 18 ml de APD fundido y enfriado a 50°C y se deja solidificar en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Posteriormente se siembra cada placa con 10 µl del inóculo estandarizado (concentración final 10^4 UFC/ml). Siempre se incluye una placa sin antimicrobiano, pero con el disolvente del antimicrobiano, como control de crecimiento, y otra sin inóculo como control de esterilidad. Las placas inoculadas se incuban a 30°C. La CMI se define como la

concentración más baja que no presenta crecimiento macroscópico a los 3 días de incubación.

En determinados experimentos se compara la velocidad de crecimiento de la cepa con y sin antimicrobiano. Para ello, se inoculan las placas directamente a partir del cultivo en tubo con APD. Las placas se cultivan de igual manera, a 30°C, y a continuación se mide el diámetro de la colonia.

2.3. CALCULO DE LA CONCENTRACION MINIMA FUNGICIDA (CMF)

Para ciertos antimicrobianos que poseen actividad fungicida, como la anfotericina B, puede ser necesario realizar otras determinaciones que evalúen su capacidad microbiocida. En la presente memoria se ha determinado la concentración mínima fungicida (CMF) de dos formas.

2.3.1. Curvas de mortalidad

Se han realizado curvas de muerte con anfotericina B y la cepa tipo de *S. prolificans*. Ante la ausencia de una metodología estandarizada para hongos filamentosos, se ha seguido el método descrito para *Aspergillus* sp. (Hughes *et al.*, 1984) con algunas modificaciones.

Se preparan tubos con concentraciones seriadas 1:10 de anfotericina B, en RPMI-2% glucosa, de la misma manera que en la técnica de macrodilución (Métodos 2.2.2.). Las concentraciones finales que se han ensayado son: 100, 10, 1 y 0,1 µg/ml. Siempre se incluye un tubo sin anfotericina B como control de crecimiento y otro sin inóculo como control de esterilidad.

Se siembra cada tubo con 100 µl del inóculo estandarizado (10^5 UFC/ml, final). Los tubos se incuban a 35°C, con la tapa aflojada. A tiempos 0, 4, 24 y 48 h se realizan los respectivos recuentos de colonias. Para ello se procede de la siguiente manera. De cada tubo se toman 100 µl, previa agitación durante 15 s para asegurar la correcta homogeneización, y se colocan en tubos de 13 x 100 mm con tapa a rosca, que contienen 0,9 ml de agua destilada. Luego se realizan las diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. De cada dilución se siembran 100 µl en placas de APD. Se deja secar levemente la gota antes de proceder a extenderla. Las placas se incuban a 35°C durante 48 h. Se

determina el número de colonias en cada placa y se calcula el número final de UFC/ml. La curva de mortalidad se realiza por triplicado para cada concentración de anfotericina B y para el control de crecimiento. Se calcula la media aritmética de los puntos de los tres experimentos y se representa mediante una gráfica el logaritmo decimal de UFC/ml, en función del tiempo en horas. También se representa gráficamente la desviación estándar en cada punto.

2.3.2. Eficiencia de plaqueo

La determinación de la eficiencia de plaqueo se realiza con la cepa tipo de *S. proliferans* y un solo antifúngico (anfotericina B o cicloheximida).

Se preparan placas de APD con una concentración subinhibitoria de antifúngico (en el caso de la anfotericina B, 5 µg/ml). Se mezclan 20 ml de APD fundido y enfriado a 50°C con la cantidad necesaria de la solución madre del antifúngico. También se preparan una placa con APD y una cantidad equivalente del disolvente del antifúngico, y dos placas con APD y agua destilada, como controles sin antifúngico.

A continuación se realizan 4 diluciones seriadas 1:10 del inóculo estandarizado. De cada dilución se siembran 100 µl en placas de APD con y sin antifúngico. Las placas se incuban a 35°C, en la oscuridad. Al cabo de 4 días se hace un conteo del número de UFC en cada placa y se compara el recuento del control de crecimiento con el de las placas con antifúngico.

2.4. COMBINACIONES DE ANTIMICROBIANOS

Se han empleado diferentes procedimientos para evaluar el efecto de la combinación de antifúngicos y/o antimicrobianos sobre *S. proliferans*.

2.4.1. Prueba rápida por macrodilución.

Previamente se ha calculado la CMI de cada antimicrobiano por separado mediante la técnica de macrodilución. Para ensayar combinaciones de antimicrobianos, se eligen las concentraciones subinhibitorias más altas de cada uno, que resultan del cálculo anterior.

Se preparan, de igual manera que en la técnica de macrodilución (Métodos 2.2.2.), tubos con las concentraciones elegidas de cada antimicrobiano por separado. También se

prepara, con el mismo esquema de diluciones decimales, un tubo con la combinación de ambas concentraciones. Siempre se incluye un tubo sin antimicrobiano como control de crecimiento y otro sin inóculo como control de esterilidad.

Se añaden 100 µl de inóculo a cada tubo (inóculo final: 10^5 UFC/ml). Los tubos se incuban a 35°C, durante 3 días, con los tapones aflojados. Antes de realizar la lectura se agitan bien, con el objeto de detectar hasta el más pequeño crecimiento. Transcurrido ese tiempo, se realiza la lectura visual. Cuando la combinación da lugar a inhibición o a un menor crecimiento apreciable respecto a los controles de cada antimicrobiano por separado, se anota y se realiza el siguiente método de ensayo de combinaciones de antimicrobianos (método del tablero de ajedrez).

2.4.2. Método del tablero de ajedrez.

Mediante este método se determinan las CMI de los antimicrobianos en solitario y en combinación (Eliopoulos y Moellering, 1996). Se enfrentan en una misma placa de microdilución diferentes concentraciones del antimicrobiano “a” en filas y diferentes concentraciones del antimicrobiano “b” en columnas.

Se preparan placas de microdilución estériles iguales a las empleadas en la técnica de microdilución (Métodos 2.2.1.). Se diluyen las soluciones madre de cada antifúngico con RPMI-2% glucosa para alcanzar el doble de las concentraciones de trabajo. Con uno de ellos (“b”) se hacen diluciones dobles seriadas en la placa de microdilución en un volumen de 50 µl, para conseguir los intervalos de concentración dobles en cada pocillo. Con el otro (“a”), se realizan también diluciones dobles, pero en tubos. A continuación se añaden por filas, a la placa de microdilución, 50 µl de cada dilución del antimicrobiano “a”. De esta manera se consiguen las concentraciones de trabajo. En el diseño del tablero de ajedrez siempre se incluyen 5 ó 6 diluciones por debajo de la CMI y 1 ó 2 diluciones por encima. Asimismo, siempre se incluye la evaluación de los antimicrobianos en solitario en una fila y una columna. En cada placa hay un pocillo sin antifúngicos como control de crecimiento.

Antes de sembrar la placa de antifúngicos combinados, siempre se hace un recuento del número de UFC del inóculo. Se inoculan 10 µl en cada pocillo de la placa de microdilución (inoculo final 10^5 UFC/ml), excepto en la columna que sirve como control de esterilidad.

La lectura visual se realiza tras incubar las placas a 35°C, durante 3 días (hasta que el control de crecimiento esté completamente crecido), pero se toma nota cada 24 h. En el caso de *Scedosporium*, la lectura visual se basa en la inhibición total del crecimiento con todos los antimicrobianos.

Los resultados se representan gráficamente mediante isobogramas (Eliopoulos y Moellering, 1996). En abscisas se representan las concentraciones del antimicrobiano “a” y en ordenadas las del “b”. La forma de la curva indica la interacción que se ha producido entre ellos. Una curva cóncava indica sinergia, una recta nos indica adición y una curva convexa o sinusoidal hace sospechar que se produce antagonismo entre los antimicrobianos.

La concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) es una representación matemática del isobograma. Para su cálculo se precisa:

CMi_a: la CMI del antimicrobiano “a” en solitario.

A: la CMI del antimicrobiano “a” en combinación.

CMi_b: la CMI del antimicrobiano “b” en solitario.

B: la CMI del antimicrobiano “b” en combinación.

$$\text{Cálculo de la CIF: } (A/\text{CMi}_a) + (B/\text{CMi}_b) = \text{CIF}_a + \text{CIF}_b = \text{Índice CIF}$$

Sinergia evidente: $\text{CIF} \leq 0,5$	Sinergia posible: $> 0,5 - < 1$
Adición: 1	Subadición: $> 1 - < 2$
Indiferencia: 2	Antagonismo: > 2 .

En la práctica la sinergia sólo es evidente cuando la CMI de cada antimicrobiano combinado se reduce al menos cuatro veces con respecto a la de cada uno de ellos por separado, lo que equivale a una $\text{CIF} \leq 0,5$. La representación gráfica da una idea más cualitativa del efecto producido. Para aquellas combinaciones claramente sinérgicas se procede a realizar el siguiente método.

2.4.3. Curvas de mortalidad.

El método de curvas de muerte mide la actividad fungicida de la combinación ensayada (Eliopoulos y Moellering, 1996). Con *S. prolificans* se han realizado curvas de

muerte para la combinación de anfotericina B y cicloheximida con la cepa tipo.

Como mínimo uno de los antifúngicos debe estar presente en una concentración que no afecte a la curva de crecimiento de *S. proliferans* cuando se emplee por separado. En este caso se ha elegido cicloheximida a una concentración de 10 µg/ml.

La metodología seguida es idéntica a la descrita para las curvas de mortalidad con un solo antimicrobiano. Se preparan tubos con la concentración final de cada antimicrobiano por separado: cicloheximida 10 µg/ml y anfotericina B 100, 10, 1 y 0,1 µg/ml, así como de sus combinaciones, empleando siempre como medio de cultivo RPMI-2% glucosa. Se prepara siempre un tubo como control de crecimiento, otro como control de esterilidad y dos más con la concentración equivalente del disolvente del antimicrobiano.

Se inocula cada tubo con 100 µl del inóculo estandarizado (final 10^5 UFC/ml), y se incuban a 35°C. A tiempos 0, 4, 24 y 48 h se realizan los recuentos de colonias y se calcula el número final de UFC/ml. La curva de mortalidad se realiza por triplicado para cada concentración y combinación y para el control de crecimiento. Se calcula la media aritmética de los puntos de los tres experimentos y se representa mediante una gráfica el log UFC/ml en función del tiempo en horas. También se representa gráficamente la desviación estándar en cada punto. Una combinación se puede definir como sinérgica cuando el número de células viables a un tiempo dado es diez veces más bajo que el del antifúngico más efectivo por separado (Eliopoulos y Moellering, 1996).

2.5. MEDIDA DEL DAÑO CELULAR

2.5.1. Daño celular producido por un antifúngico.

El ensayo se lleva a cabo con la cepa tipo de *S. proliferans* y con el antifúngico en concentraciones subinhibitorias para el crecimiento. Para anfotericina B y cicloheximida: 10, 1 y 0,1 µg/ml en tampón fosfato. La sal de tetrazolio XTT se prepara en el momento de su uso a 0,5 mg/ml en tampón fosfato, calentando a 60°C durante 30 min. Se esteriliza por filtración a través de un filtro de jeringa de un tamaño de poro de 0,22 µm. La coenzima Q se prepara a 5 mg/ml en tampón fosfato y se congela en alícuotas a -70°C.

A tubos de centrifuga que contienen 1 ml de medio CM se añaden 100 µl del inóculo estandarizado (inóculo final $1-2 \cdot 10^5$ UFC/ml). Se incuba a 30°C y 100 rpm

durante 14,30 h. Se trata de obtener más del 90% de esporas germinadas, con una longitud media de las hifas de 30 μm . Después de este tiempo se lava una vez con tampón fosfato (13.000 rpm, 12 min) y se añaden a cada tubo las soluciones de antifúngicos en un volumen final de 1 ml. Siempre se tienen tubos sin inóculo pero con cada concentración de antifúngico, con el disolvente de la solución madre del antifúngico y un tubo sólo con tampón fosfato. También se preparan como controles tubos con inóculo en tampón fosfato, sin antifúngico y con el disolvente de la solución madre del antifúngico. Los tubos preparados de esta forma se incuban durante 1 h a 37°C. Pasado este tiempo, se centrifuga y se lava cuidadosamente con 1 ml de agua destilada. A continuación se añade a cada sedimento 0,4 ml de la solución de XTT (concentración final 0,5 mg/ml) y 3,2 μl de coenzima Q (concentración final 40 $\mu\text{g/ml}$). Los tubos se incuban 1 h a 37°C, se centrifuga como antes y se transfieren 100 μl de cada tubo a cada pocillo de una placa de microdilución. Se mide la absorbancia a $\lambda = 450 \text{ nm}$. El porcentaje de daño celular se calcula con la ecuación (Meshulam *et al.*, 1995):

$$\{1 - [(A_{450}\text{hifa} - A_{450})\text{con antifúngico}] / [(A_{450}\text{hifa} - A_{450})\text{sin antifúngico}]\} \times 100$$

El experimento se repite 3-4 veces, calculando la media y la desviación estándar. El daño celular se representa en un diagrama de barras.

2.5.2. Daño celular producido por dos antifúngicos.

El ensayo se realiza con la cepa tipo de *S. prolificans* y las combinaciones de anfotericina B y cicloheximida. Previamente se ha realizado el ensayo anterior con los antifúngicos por separado. Se eligen aquellas combinaciones en las que los antifúngicos independientemente producen un daño celular inferior al 50%. Son las siguientes:

- anfotericina B 0,1 $\mu\text{g/ml}$ + cicloheximida 0,1 $\mu\text{g/ml}$
- anfotericina B 1 $\mu\text{g/ml}$ + cicloheximida 0,1 $\mu\text{g/ml}$
- anfotericina B 0,1 $\mu\text{g/ml}$ + cicloheximida 1 $\mu\text{g/ml}$
- anfotericina B 1 $\mu\text{g/ml}$ + cicloheximida 1 $\mu\text{g/ml}$

La metodología es exacta a la del daño celular producido por un solo antifúngico. En este caso se incluyen además los tubos con las combinaciones de antifúngicos

preparadas en tampón fosfato. El daño celular se calcula de igual manera, se representa y se comparan las combinaciones frente a los antifúngicos por separado.

3. METODOS GENERALES DE BACTERIOLOGIA Y GENETICA MOLECULAR

3.1. MANIPULACION DE BACTERIAS

3.1.1. Cultivo y conservación de bacterias

Los cultivos bacterianos se crecieron en medio líquido, a 37°C. Las bacterias se guardaron congeladas a -20°C y -80°C en leche descremada.

3.1.2. Preparación de bacterias competentes y transformación.

Se ha aplicado el método del cloruro de rubidio, de acuerdo con los protocolos descritos por Hanahan (1985).

3.1.3. Purificación del DNA plasmídico

Para la purificación de plásmidos a pequeña escala se ha empleado el método de la lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979). Para la obtención de plásmidos a media escala (300-500 µg de DNA, a partir de 40-50 ml de cultivo de células transformadas), se ha empleado el método comercial Quantum-Midiprep (Bio-Rad).

3.1.4. Obtención del DNA plasmídico de cadena sencilla

El DNA plasmídico de cadena sencilla se obtuvo mediante la infección con el fago M13K07 de los cultivos bacterianos, siguiendo los protocolos recogidos por Sambrook *et al.* (1989).

3.2. MANIPULACIONES ENZIMATICAS BASICAS

Para las digestiones de DNA con enzimas de restricción, ligación con DNA ligasa de T4 y tratamiento con fosfatasa alcalina, se han utilizado las condiciones recomendadas por Sambrook *et al.* (1989) o por el suministrador.

3.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El tampón utilizado ha sido TAE. Los geles de agarosa se tiñen durante 5 min con una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml) y se observan bajo la luz UV (>2500 µW/cm²) (Sambrook *et al.*, 1989). Los geles se fotografian con una cámara Polaroid CU-5 usando películas Polaroid 665.

3.4. SECUENCIACION

La secuenciación de DNA se ha realizado por el método de la terminación de cadena con didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) con la enzima DNA polimerasa de T7 y α-³⁵S-dATP (Amersham). Los oligonucleótidos empleados se detallan en Materiales 3.3. Se han seguido las indicaciones del fabricante (Pharmacia) para la secuenciación de DNA de cadena sencilla. Las reacciones de secuencia se cargan en geles de poliacrilamida al 8% y urea 8,3 M en tampón TBE, y se corren en el mismo tampón y en las condiciones siguientes: 45 W, 2600 V y 60 mA. Finalmente, los geles se secan y las secuencias se visualizan por autorradiografía.

4. AISLAMIENTO DE DNA DE HONGOS FILAMENTOSOS

4.1. A PEQUEÑA ESCALA

El método empleado es el descrito por Bowman (1993) con ligeras modificaciones.

Se parte inicialmente de un cultivo de *S. prolificans*, en agar Sab, procedente de una sola espora obtenida por la técnica de la dilución limitante. A partir de dicho cultivo se prepara una suspensión de 10⁶ esporas por ml de agua biautoclavada, de igual manera que

en las pruebas de sensibilidad a antifúngicos (Métodos 2.1.). A continuación se inoculan 10 ml de Sab líquido con 100 μ l del inóculo anterior, en un frasco de 100 ml con perlas de vidrio. La incubación se realiza en un agitador orbital, durante 48 h a 35°C y 150 rpm y a continuación se recoge el micelio por centrifugación (13.000 rpm, 15 min, 25°C). Después se lava dos veces el micelio (resuspendiendo por agitación y centrifugando como anteriormente) con 1 ml de tampón SE por cada 1,5 ml del cultivo inicial, resuspendiéndolo finalmente en 400 μ l de tampón de extracción de DNA de hongos filamentosos a pequeña escala (Materiales 4) y añadiendo una pequeña cantidad de perlas de vidrio. El micelio debe quedar muy bien resuspendido sin llegar a degradarse, para lo cual se agita a baja velocidad durante al menos 15 s. A continuación se incuba durante 2 h a 65°C, mezclando por inversión cada 30 min. El DNA genómico se purifica por una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y seguidamente otra extracción con cloroformo:alcohol isoamílico. El procedimiento para las extracciones consiste en agitar los tubos 30 s, dejándolos reposar en hielo otros 30 s y repitiendo este proceso 6 veces para, a continuación, separar la fase orgánica de la acuosa con una centrifugación (13.000 rpm, 15 min, 25°C). El DNA se precipita a -20°C, 20 min con 0,06 volúmenes de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Finalmente, se seca a vacío (con un equipo Univapo 100H, Uniequip, S.A.) y se resuspende en 100 μ l de tampón TE. El DNA se almacena a -20°C hasta su purificación.

Con este método se obtienen alrededor de 1,5-2 μ g de DNA de *S. prolificans*, a partir de 10 ml de cultivo.

4.2. A MEDIA ESCALA

Se siguió el procedimiento de ruptura mecánica descrito por Holden (1994).

Se siembra un césped de 10^6 esporas (preparadas de igual manera que en Métodos 2.1.) en placas de Petri de 6 cm de diámetro con 3 ml de GEPD. Se incuba a 37°C hasta que el micelio se desarrolle (varía según la cepa, pero suele ser alrededor de 48 h). Posteriormente se recoge el micelio con una punta de pipeta de plástico estéril y se deja secar sobre papel Whatman 3MM Chr durante aproximadamente 10-20 min. El micelio debe estar muy seco. A continuación se deposita en un tubo de polipropileno de 50 ml con tapón a rosca que contenga 6 perlas de vidrio de 4 mm de diámetro. Se introduce la parte inferior de dicho tubo en nitrógeno líquido durante 30 s para, seguidamente, agitar en el

vortex a máxima velocidad durante 30 s. Este proceso se puede repetir 3 veces hasta que el micelio esté completamente fragmentado. Tras ello se añaden 0,8 ml de tampón de extracción de DNA de hongos filamentosos a media escala (Materiales 4) y 0,8 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, agitando suavemente. La emulsión se transfiere a tubos de microcentrífuga, empleando una pipeta Pasteur de polipropileno, y se centrifuga durante 15 min a 13.000 rpm y 25°C. Esta extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico se realiza otra vez más y, finalmente, se extrae de igual manera con cloroformo:alcohol isoamílico. El DNA fúngico se precipita con 0,6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente y se recoge por centrifugación durante 15 min a 13.000 rpm. El precipitado se lava con 1 ml de etanol al 70%, centrifugando a temperatura ambiente durante 5 min a 13.000 rpm. Tras el secado, el DNA se resuspende en 100 µl de TE, guardándose a -20°C hasta su purificación.

Con este método se obtienen alrededor de 2 µg de DNA de *S. prolificans*, a partir de una placa de Petri con 3 ml de medio.

4.3. PURIFICACION DEL DNA FUNGICO

Se parte de DNA resuspendido en TE. En primer lugar se incuba con RNasa A (concentración final 100 µg/ml) durante 1 h a 37°C. Seguidamente se añade proteinasa K (concentración final 50 µg/ml) y se incuba también durante 1 h a 37°C. Se espera a que alcance la temperatura ambiente y se realizan dos extracciones: la primera con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y la segunda con cloroformo:alcohol isoamílico, de la manera anteriormente descrita (Métodos 4.1.). Para terminar, el DNA se precipita a -20°C, 20 min, con 0,06 volúmenes de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. El DNA se resuspende en agua bidestilada o tampón TE, en función de la aplicación posterior. Las muestras de DNA se almacenan a -20°C hasta su utilización.

4.4. CUANTIFICACION DEL DNA

Se preparan diluciones seriadas, en tampón TE, del DNA total obtenido por cualquiera de los dos métodos. Se añade 1:5 de tampón de carga por cada muestra. La concentración y estabilidad del DNA se calcula mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Como control se preparan diluciones consecutivas del DNA comercial

del fago λ (Pharmacia). Tras la electroforesis, la cantidad de DNA se calcula por comparación de la intensidad de fluorescencia a la luz UV de las diluciones problema con las del patrón (Sambrook *et al.*, 1989).

5. METODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACION DE ESPECIES

5.1. REACCION DE AMPLIFICACION DEL rDNA

El rDNA de *Scedosporium* sp. ha sido amplificado por PCR como lo describen White *et al.* (1990) con algunas variaciones. Se han empleado los iniciadores universales ITS1 e ITS4. El iniciador ITS1 va dirigido hacia un dominio conservado en 3' dentro del rDNA de la subunidad 18S. ITS4 es un iniciador reverso, que se dirige a una región conservada del rDNA de la subunidad grande 28S del rDNA (figura 2, Resultados 1.1.). La reacción se realiza en un volumen final de 100 μ l. Las concentraciones finales de los reactivos son: 200 μ M de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); $MgCl_2$ 1,5 mM; KCl 50mM; Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM; 0,5 μ M de cada oligonucleótido; 2,5 unidades de polimerasa *Taq* y 10 ng de DNA genómico. Las muestras se recubren con 60 μ l de aceite mineral estéril para prevenir la evaporación. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador Gene Aaq Controller (Pharmacia). Las condiciones de la PCR son: una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de desnaturalización (95°C, 1 min), acoplamiento (55°C, 1 min) y extensión (72°C, 2 min), más una extensión final de 10 min a 72°C. Los amplificados se analizan por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (Métodos 3.2.).

5.2. ANALISIS DE RESTRICCION DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Las endonucleasas de restricción *Hae*III y *Hha*I se emplean en reacciones de digestión separadas, con los fragmentos del rDNA amplificados por PCR de las dos especies de *Scedosporium*. Se digieren 35 μ l de cada uno de los amplificados a 37°C, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Pharmacia). Las muestras digeridas se separan por electroforesis a 40 V durante 5 h en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve) al 3,4% (Sambrook *et al.*, 1989).

5.3. CLONAJE DEL DNA Y SECUENCIACION

Para clonar y posteriormente secuenciar los amplificados, se han seleccionado dos cepas de *S. prolificans* (NCPF 2884 y ATCC 44330) y una de *S. apiospermum* (cepa tipo de *P. boydii*, CBS 101.22). Las casi 600 pares de bases del fragmento de rDNA amplificado por PCR, se han purificado a través de una columna Chromaspin-TE 200S (Clontech). A continuación los productos purificados se ligan al vector pGemT (Sambrook *et al.*, 1989) y se secuencian ambas hebras del inserto (Métodos 3.4.). Asimismo, se secuencian dos clones de cada producto de amplificación con el objeto de confirmar la secuencia del inserto. Para completar la secuencia se han empleado dos iniciadores internos (White *et al.*, 1990): ITS3 y su complementario reverso ITS2. También se han diseñado otros dos iniciadores internos distintos para cada especie; para *S. prolificans* es ITS8, y para *S. apiospermum* ITS10 (Materiales 3.3.).

5.4. ANALISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA.

Las secuencias similares se identifican por comparación con la base de datos del Genbank utilizando el programa BLAST. La secuencia del complejo ITS1-5,8S-ITS2 (figura 1, Introducción 2) ha sido analizada con el programa CLUSTAL V (Higgins *et al.*, 1992), que aplica el método del "vecino próximo" o "Neighbor-Joining a la distancia y los datos de alineamientos. El programa CLUSTAL V está disponible dentro del paquete informático Lasergene para Windows versión 1997 (DNASTAR, Inc.). El DNASTAR emplea este programa para establecer identidades, así como para realizar los árboles filogenéticos.

6. METODOS MOLECULARES DE CARACTERIZACION SUBESPECIFICA

6.1. AMPLIFICACION ALEATORIA DE DNA POLIMORFICO (RAPD)

Los oligonucleótidos empleados son GC70 y GC80 (Williams *et al.*, 1993) (Tabla 4 de Materiales 3.3.). Las concentraciones finales de los componentes de la reacción de RAPD son: 200 μ M de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); $MgCl_2$ 2,5 mM; 1 μ M del iniciador; 2,5 unidades de polimerasa *Taq*; Tris-HCl (pH 8,5) 10 mM - KCl 50

mM, como tampón; y 25 ng de DNA molde, en un volumen final de 50 µl. Las muestras se recubren con 25 µl de aceite mineral estéril para prevenir la evaporación. La amplificación se efectúa en un termociclador Gene Aaq Controller (Pharmacia). La reacción de RAPD se realiza empleando un programa de 40 ciclos que consisten en una desnaturalización (1 min, 94°C), un acoplamiento (1 min, 36°C) y una extensión (2 min, 72°C) (Williams *et al.*, 1993). Los productos de reacción se mantienen a 4°C hasta su análisis. En cada experimento se incluyen controles negativos con todos los reactivos excepto el DNA molde o el iniciador.

6.2. PCR DIRIGIDA A MINISATELITES DE EUCARIOTAS ("PCR-fingerprinting")

La amplificación con la secuencia central del fago M13 como único iniciador se realiza siguiendo las condiciones descritas por Meyer *et al.* (1993), con diversas modificaciones. Las concentraciones finales de los componentes de la reacción son: 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); MgCl₂ 3,5 mM; 1 µM del iniciador M13; 2,5 unidades de DNA polimerasa *Taq*; Tris-HCl (pH 8,5) 10 mM - KCl 50 mM como tampón; y 50-100 ng de DNA molde, en un volumen final de 100 µl. Las muestras se cubren con 60 µl de aceite mineral. Las condiciones de la reacción fueron: 1 min de desnaturalización inicial a 95°C, seguido de 30 ciclos (20 s a 95°C, 60 s a 50°C y 20 s a 72°C). La extensión final fue de 6 min a 72°C (Meyer *et al.*, 1993; Berenguer *et al.*, 1996). Los productos de reacción se mantienen a 4°C. También se controla cada experimento con muestras negativas.

6.3. ANALISIS DE LAS REACCIONES DE AMPLIFICACION

Los productos de las reacciones de amplificación se analizan por electroforesis en gel de agarosa al 1,3% (Métodos 3.3.). En el caso de los RAPDs las condiciones de electroforesis son 65 V durante 2,20 h. Sin embargo, para la "PCR-fingerprinting" son de 35 V, 17 h. Los patrones de PCR se comparan visualmente por dos personas diferentes.

7. OBTENCION DE MUTANTES

7.1. AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTANEOS

La cepa objeto de estudio se cultiva en APD, incubándola 8-9 días a 30°C. Al cabo de este tiempo se preparan diferentes inóculos de dicha cepa, por métodos espectrofotométricos hasta 10^7 esporas/ml, y por filtración para más de 10^7 esporas/ml (Métodos 1.2. y 1.4.). Estos inóculos se diluyen o se concentran en un volumen de 100 μ l. A continuación se siembran las diferentes diluciones o la suspensión de esporas concentrada en APD normal o suplementado, en función del fenotipo que se trate de analizar. Las placas se incuban a 30°C durante 3-4 días. Aquellas colonias aisladas que presentan el fenotipo objeto de análisis se subcultivan en el mismo medio, con el objeto de observar su estabilidad.

7.2. OBTENCION DE MUTANTES INDUCIDOS CON LUZ UV

7.2.1. Curvas de dosis-supervivencia.

7.2.1.1. Preparación del inóculo.

Se emplean dos cepas de *S. prolificans*, la cepa ex-tipo y la cepa tipo (Tabla 2 de Materiales 1.3.). La cepa objeto de estudio se cultiva en APD durante 8-9 días a 30°C. Se prepara una suspensión de 10^6 esporas/ml, de igual forma que en las pruebas de sensibilidad a antifúngicos (Métodos 2.1.). Las suspensiones procedentes de distintos tubos son reunidas hasta un volumen total de 25 ml.

7.2.1.2. Supervivencia a la luz UV

Para realizar el tratamiento con luz UV se siguió la metodología tradicional descrita por diferentes autores (Davis y De Serres, 1970; Carlton y Brown, 1981).

La suspensión de esporas se deposita en una placa de Petri estéril de 9 cm de diámetro, que contiene en su interior una varilla magnética agitadora de 4 cm de longitud, previamente esterilizada. Todo ello se coloca sobre una placa agitadora pequeña. La suspensión de esporas se somete, siempre en agitación suave y en la oscuridad, a la acción

de los rayos UV que proceden de una lámpara Vilber Lourmat VL-215LC (15 W), con una longitud de onda de 254 nm y una intensidad de radiación de 930 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Previamente a cada experimento, la lámpara se enciende durante quince minutos, para permitir que se estabilice la emisión de luz UV. Para efectuar el tratamiento esta lámpara se coloca a 10 cm de la placa. Se deja actuar durante 2 min, realizándose tomas de muestras cada 10 s.

7.2.1.3. Recuento de supervivientes

Se realiza tomando 1 ml de la suspensión de esporas antes de realizar el tratamiento mutagénico. A partir de este volumen se hacen diluciones decimales seriadas en agua estéril, sembrando de cada una de ellas 0,1 ml en placas de APD. Esto mismo se hace con cada muestra, pero haciendo las diluciones y las siembras con luz natural débil y lo más rápidamente posible, para evitar la fotorreactivación (Davis y De Serres, 1970). Las placas se incuban durante 3-4 días a 30°C, en la oscuridad. Pasado este tiempo, se realiza el recuento de las UFC, calculando posteriormente el porcentaje de supervivientes y representándolo gráficamente en escala logarítmica.

7.2.2. Curvas de aparición de mutantes

Se ha realizado con la cepa tipo de *S. prolificans*. La metodología es idéntica a la seguida en las curvas de dosis-supervivencia. Se contó en cada tiempo de irradiación, y para cada dilución, el número de colonias que presentaban el fenotipo objeto de estudio. A continuación se representa gráficamente, enfrentando la curva de aparición de mutantes a la correspondiente de dosis-supervivencia para cada experimento.

8. TRANSFORMACION GENETICA DE *S. prolificans*

8.1. ELECTROPORACION

La electroporación se ha realizado con un aparato de transfección "Gene Pulser" (Bio-Rad versión 2-89) equipado con un controlador de pulsos (Bio-Rad versión 8-90), el cual es capaz de generar pulsos de hasta 2500 V con una capacidad de 0,25 a 25 μF .

En los experimentos de electroporación se ha empleado siempre la cepa tipo de *S. prolificans* como receptor. La electroporación se ha realizado de manera similar a la descrita por Chakraborty *et al.* (1991).

A partir de un cultivo de 15 días, se prepara una suspensión de $0,5-1 \cdot 10^7$ esporas/ml y se incuban para que germinen en medio CM a 30°C y 100 rpm. A continuación se añaden β -glucuronidasa y quitinasa a una concentración de 1 mg/ml y 1 U/ml, respectivamente. La incubación continúa durante dos horas más. El progreso de la germinación se controla por observación al microscopio a intervalos regulares. Se elimina el medio de cultivo por centrifugación a 3500 rpm durante 12 min. Las esporas germinadas se lavan dos veces con tampón de electroporación, centrifugando como antes y finalmente se resuspenden en dicho tampón (densidad final: $1-4 \cdot 10^7$ esporas/ml). Para electroporar se añaden 1 μ g de DNA plasmídico lineal (en 10 μ l de agua) o 10 μ l de agua (control) a 100 μ l de la suspensión de conidias. La mezcla se incuba en hielo durante 15 min y se transfiere a una cubeta de electroporación de 0,2 cm de distancia entre electrodos. Las constantes de electroporación son: 2.500 V, 25 μ F y 200 Ω (la duración del pulso varía entre 4,3 y 4,5 ms). Como control de la confianza del sistema de electroporación se emplea una cepa de *Neurospora crassa* (Tabla 3 de Materiales 1.3.).

Nada más electroporar se añade 1 ml de CM frío a la cubeta, y la suspensión resultante se transfiere a un tubo estéril de 10 ml. Se conserva en hielo durante 15 min y a continuación se incuba a 30°C y 100 rpm durante 90 min. Pasado este tiempo se extiende en placas de APD y se incuba a 30°C, 18 h. Luego se añade una sobrecapa de agar blando CM con higromicina B a una concentración final de 50 μ g/ml y se prosigue la incubación. Las colonias de transformantes se observan microscópicamente a los pocos días y se hacen visibles claramente a las 2 semanas, y continúan apareciendo durante varias semanas (habitualmente se incuban las placas hasta 5 semanas). Para cada experimento se controla la viabilidad de las células tras la electroporación mediante recuentos en medio no selectivo. En las condiciones descritas, aproximadamente el 30-35% de las esporas de *S. prolificans* son inviables.

8.2. ANALISIS MOLECULAR DE LOS TRANSFORMANTES

8.2.1. PCR

El DNA de los transformantes es extraído por los métodos antes descritos (Métodos 4.1. y 4.2). Los iniciadores se diseñaron de acuerdo a las secuencias del gen *hph* de las posiciones 1947-1965 y en la hebra reversa 2906-2885 (Rohe *et al.*, 1996). Los números corresponden a la secuencia del pMLF2 (número del Genbank L76273) y la secuencia se detalla en Materiales 3.3. La PCR se lleva a cabo en un volumen de 100 μ l, con 200 μ M de cada nucleótido; $MgCl_2$ 1,5 mM; KCl 50mM; Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM; 0,5 μ M de cada oligonucleótido; 2,5 unidades de *Taq* y 50 ng de DNA genómico. La amplificación se realiza en un termociclador Progene (Techne) con los siguientes parámetros: desnaturalización (94°C, 5 min), 40 ciclos (94°C, 1min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min) y extensión final de 72°C, 10 min. Se incluyen controles negativos y positivos en cada reacción. Los productos se analizan por electroforesis en gel de agarosa (Métodos 3.3.).

8.2.2. Hibridación por el método de Southern

El fragmento del gen *hph* amplificado por PCR se emplea como sonda en los experimentos de hibridación. Este fragmento de 960 pb se purifica a través de una columna Chromaspin-TE 400S y se marca con fluoresceína (ECL-random prime system, Amersham).

Aproximadamente 3 μ g de DNA total de los transformantes y de la cepa receptora se digieren con 20 U de *Bam*HI. Los fragmentos de DNA se separan en un gel de agarosa al 0,8 % durante 4 h a 4 V/cm. El DNA se transfiere mediante vacío (Vacugene XL, Pharmacia), siguiendo procedimientos habituales (Sambrook *et al.*, 1989), a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham). El DNA se fija a la membrana con luz UV (Ultraviolet crosslinker, Amersham). Los fragmentos de DNA transferidos se hibridan con la sonda (2,5 ng/ml) en el tampón de hibridación, a 60°C durante 18 h. Posteriormente, la membrana se lava dos veces con las soluciones de lavado I y II a 60°C (15 min por cada lavado). La detección de la sonda, empleando un anticuerpo antifluoresceína, se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante del sistema (Amersham). Las posiciones de las bandas se identifican por comparación con las del DNA del fago lambda digerido con *Hind*III y marcado con fluoresceína.

RESULTADOS

1. IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES. TAXONOMIA MOLECULAR DEL GENERO *Scedosporium*

1.1. ANALISIS DE RESTRICCION DE LA REGION ITS1-5,8S-ITSII

Los iniciadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) se emplearon para amplificar mediante PCR la región del rDNA correspondiente a los espaciadores transcritos ITS1 e ITSII y el gen 5,8S. También se amplificó una pequeña región, correspondiente a los iniciadores, de las subunidades 18S y 28S. En la figura 2 se representa la posición y el sentido de los iniciadores empleados.

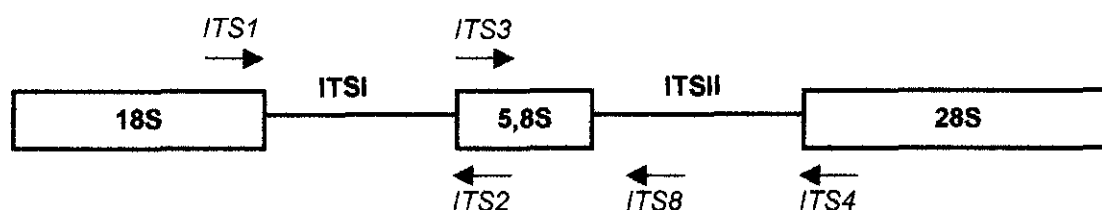


Figura 2. Esquema de la región del rDNA nuclear ITS1-5,8S-ITSII, con los iniciadores empleados para su amplificación y posterior caracterización. El iniciador ITS8 fue diseñado específicamente para *S. prolificans*, y en su misma posición se localiza ITS10, diseñado para *S. apiospermum* (Métodos 5.3).

La PCR se realizó con diferentes cepas de *S. prolificans*, como se refleja en la Tabla 6. Todos los productos de PCR tenían un tamaño aproximado de 600 pb (figura 3). A continuación, se llevaron a cabo reacciones separadas de digestión, con las enzimas *Hae*III y *Hha*I, de los productos de PCR de las 16 cepas de *S. prolificans*. Los fragmentos de restricción generados fueron idénticos en las 16 cepas.

Para hacer una comparación entre las dos especies del género imperfecto *Scedosporium*, se seleccionaron dos cepas de *S. apiospermum* (Tabla 6). Una de ellas es la cepa tipo de su teleomorfo *P. boydii*. Estas dos cepas fueron utilizadas para extraer DNA genómico que se amplificó con los mismos iniciadores, y los productos de PCR se digirieron con las dos enzimas citadas. Los amplificados de *S. apiospermum* fueron también idénticos entre sí (con un tamaño aproximado de 620 pb). Asimismo, son iguales los patrones de restricción de ambas cepas.

Tabla 6. Especies/cepas empleadas en el estudio taxonómico

Especies	Número de cepa ^a	Nº acceso en el Genbank de la secuencia ITS1-5,8S-ITS2
<i>S. prolificans</i>	NCPF 2884	AF022485
<i>S. prolificans</i>	ATCC 64913	AF022484
<i>S. prolificans</i>	CBS 467.74	
<i>S. prolificans</i>	13 cepas descritas ^b	
<i>P. boydii</i>	CBS 101.22	AF022486
<i>S. apiospermum</i>	CNMM 195	

^a El origen detallado de las cepas se especifica en las Tablas 1 y 2 de Materiales 1.3.

^b Las cepas corresponden a las descritas en el apartado 4.2. de Resultados y en el artículo previo (Ruiz-Díez *et al.*, 1997).

Los patrones generados por el análisis de restricción de la región amplificada ITS1-5,8S-ITS2 son reproducibles y pueden distinguir las dos especies relacionadas, como se describió previamente (Lennon *et al.*, 1994). En la figura 3 se presentan, como ejemplo, los amplificados y productos de restricción de *S. prolificans* NCPF 2884 y *S. apiospermum* CBS 101.22.

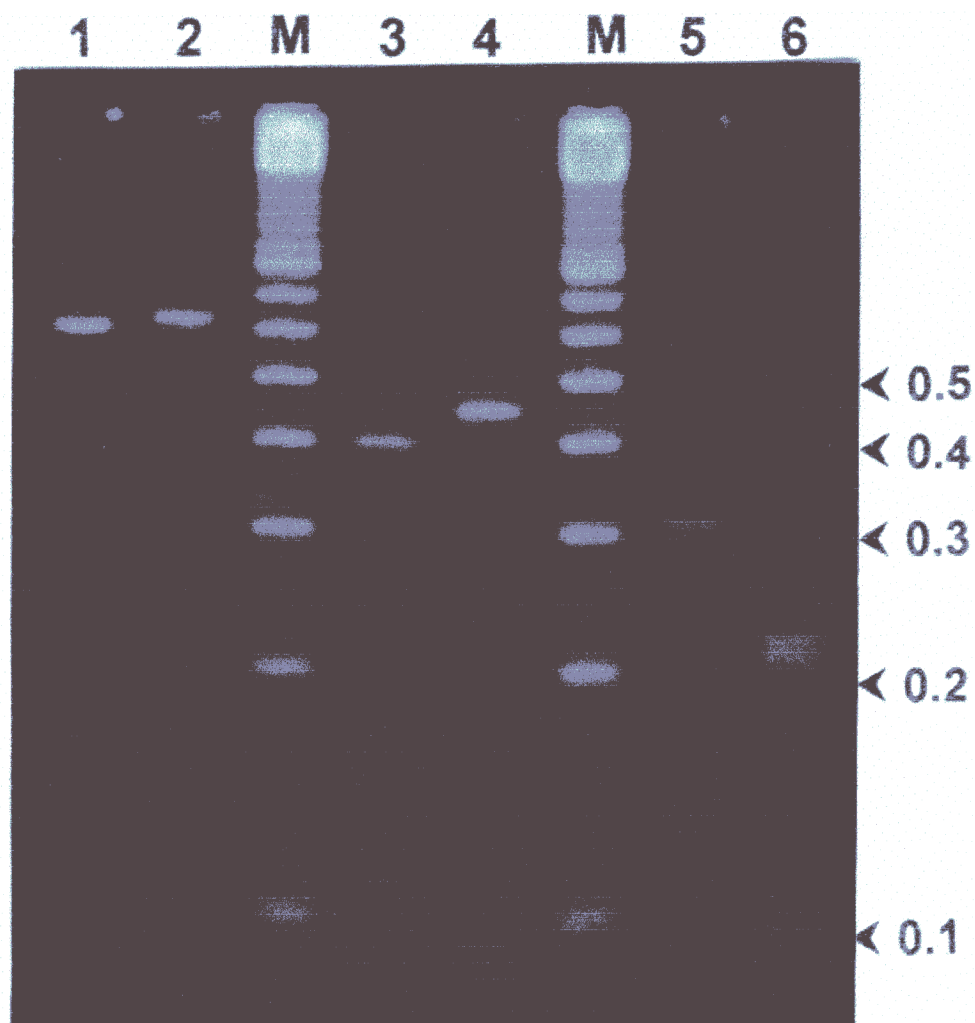


Figura 3. Ejemplo de los productos de PCR de la región del rDNA ITS1-5,8S-ITSII y sus digestiones con endonucleasas. Pocillo 1, PCR de *S. prolificans* NCPF 2884. Pocillo 2, PCR de *S. apiospermum* ATCC 44330. Pocillo 3, digestión con *HaeIII* *S. prolificans* NCPF 2884. Pocillo 4, digestión con *HaeIII* *S. apiospermum* ATCC 44330. Pocillo 5, digestión con *HhaI* *S. prolificans* NCPF 2884. Pocillo 6, digestión con *HhaI* *S. apiospermum* ATCC 44330. Pocillo M, marcador de 100 pb. Los tamaños moleculares están indicados en kilobases.

1.2. SECUENCIACION DE LA REGION ITS1-5,8S-ITS2

La secuencia completa de la región ITS1-5,8S-ITS2 no había sido descrita en las dos especies de *Scedosporium*. Con el fin de completar su caracterización, se seleccionó primero una cepa de *S. prolificans* (NCPF 2884). Su rDNA amplificado se clonó en el vector p-GemT y se secuenciaron las dos hebras del inserto. Además, como verificación, se secuenció otra cepa adicional de *S. prolificans* (ATCC 64913). Las secuencias de ambas cepas de *S. prolificans* resultaron ser totalmente idénticas. Con objeto de comparar las dos especies, se secuenció la misma región de la cepa tipo de *S. apiospermum* (*P. boydii* CBS 102.22). Las secuencias obtenidas fueron incorporadas a la base de datos del Genbank (el código de acceso se detalla en la Tabla 6). El principio y el final de la región se dedujeron por comparación con la secuencia descrita de *Neurospora crassa* (Chambers *et al.*, 1986). Las secuencias se alinearon con la máxima homología. El tamaño total de la región resultó ser diferente en las dos especies (figura 4), como se suponía al comparar los amplificados en geles de agarosa (figura 3). El porcentaje de G + C de esta zona resultó ser del 50,7% en *S. prolificans* y del 52,73% en *S. apiospermum*. En la figura 4 se muestra la alineación de las secuencias de *Scedosporium* y *N. crassa*, donde se puede observar que la zona que presenta mayor variabilidad interespecífica es ITS2. La región más conservada coincide con el gen 5,8S.

También se han examinado las diferencias entre ambas especies en relación a su composición de bases. La Tabla 7 resume las divergencias encontradas. El grado total de diversidad encontrada (de la región completa) entre las dos especies de *Scedosporium* es del 11,6%.

Tabla 7. Diferencias entre los nucleótidos de la región (ITS1-5,8S-ITS2) de *Scedosporium* sp.

Región comparada	TS ^a	TV ^b	I/D ^c
ITS1	13	12	6
ITS2	16	12	8
5,8S	0	0	2
ITS1-5,8S-ITS2	29	24	14

^a TS, transiciones de A por G ó C por T

^b TV, transversiones de A/G por C/T

^c I/D, inserciones/delecciones, las variaciones en longitud mayores de un nucleótido se consideran como 1.

	1	
<i>S. prolificans</i>	CCGAGTTATT A _ _ _ CTCCA AAGCC TTTGT GAACCTTACCTATGTT CTGT	
<i>P. boydii</i>	A _ _ _ C _ _ _ _ _ A _ _ _ _ _	
<i>N. crassa</i>	A _ _ _ GCA AACT C AC _ _ A _ _ A C C _ _ T _ _ _ CG A _ _ G	
	51	
<i>S. prolificans</i>	TGCCTCGGCGGGGA _ _ _ _ _ GGAAGAC _ _ _ _ CCTTAAA AA _ _ _ GGGC	
<i>P. boydii</i>	_ _ _ _ C T _ _ _ _ _ TCA G G C C C _ _ T C G _ _ _ _ A G	
<i>N. crassa</i>	_ _ _ _ CT GC GGTCC _ _ _ A GG _ _ _ _ T C G G G C C T C C C _ _ A T	
	101	
<i>S. prolificans</i>	CCAG _ _ _ CC CCGC CGGCA GC _ _ _ ACCAAACTCTTGCA _ TTT ATAG	
<i>P. boydii</i>	A GATGCC T _ _ _ _ _ _ _ _ _ TG AT _ _ C	
<i>N. crassa</i>	_ _ TCGGGT T _ _ _ _ TC _ G _ TGC CCG _ GG G GCC A AC A A CT C	
	151	
<i>S. prolificans</i>	CGGAT T _ _ _ _ ACAT TTCTGAATAC AATAC AAA _ _ ACAAA TCAAA A GTTT	
<i>P. boydii</i>	_ _ _ _ _ G _ _ _ _ T TG A _ _ _ AA _ _ G T	
<i>N. crassa</i>	TT _ _ _ TTTATGTC C _ _ _ _ G A C TTT _ _ _ T G	
	201	
<i>S. prolificans</i>	CAACAACGGA TCTCT TGGTT CTGGCATCGA TGAAGAACCGAGCGA A ATGC	
<i>P. boydii</i>	_ _	
<i>N. crassa</i>	_ _	
	251	
<i>S. prolificans</i>	GATAA GTAATGTGAATTGCA GAATTGAGTG AATCATCGAATCTTTG A A C G	
<i>P. boydii</i>	_ _	
<i>N. crassa</i>	_ _ _ _ _ g _	
	301	
<i>S. prolificans</i>	CACAT TGGCC C _ GGC AGTAATCTGCCGG CATGCCCTGTCCGAGCGT CAT T	
<i>P. boydii</i>	_ _ _ _ _ C _ _ _ _ _ G _ _ _ _ _	
<i>N. crassa</i>	_ _ _ _ _ TC C _ _ _ _ T _ _ _ G AG _ _ _ _ T	
	351	
<i>S. prolificans</i>	TCAAC CCTCG AGCCT AGGTT TTTACA _ _ _ AGCCCAAGGATCGGTGT TGGG	
<i>P. boydii</i>	_ _ _ _ _ A _ _ CC _ _ _ CCT _ GGG AG TC _ _ G	
<i>N. crassa</i>	_ _ _ _ _ A A _ _ TCT C _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ C	
	401	
<i>S. prolificans</i>	GCGCTACGGT _ _ _ TGT CATCTGACC GCGGT AGGCTCTGAA ATACAG TGGC	
<i>P. boydii</i>	_ _ _ _ _ CGAG C TCG GAC _ T _ _ _ C _ _ _ _ _	
<i>N. crassa</i>	_ _ AT CG _ _ C _ _ _ _ _ CG _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ AT _ _ _ _	
	451	
<i>S. prolificans</i>	GGTCCCGGCGCGG C GCCTTCTGCGTAGTA GATTTAC _ _ _ _ AAC TCGC	
<i>P. boydii</i>	_ _ _ _ _ TT _ _ _ _ _ AG C CTTTTGCA G _ _ _ _	
<i>N. crassa</i>	_ _ G T _ _ T A _ _ T A ACCGA _ _ _ G _ GAC C _ _ _ _ _ T G _ T	
	501	
<i>S. prolificans</i>	ATTGGGTCCC GBCGA AGGCC AGCCGTCAAA CCCTCTATTGTT _ _ _ ATGGT	
<i>P. boydii</i>	_ _ _ _ _ G _ _ T _ _ _ _ AC _ _ _ AAC CCA G _ _ _ _	
<i>N. crassa</i>	_ _ G TCGTG _ _ _ G G T T T T _ _ _ A _ _ _ C C _ _ T C _ _ _ A _ _	

Figura 4. Alineación de la secuencia de la región ITS1-5,8S-ITSII de *Scedosporium* sp. Para la alineación se empleó como comparación la secuencia de *N. crassa*. Las zonas sombreadas delimitan el gen 5,8S. Las bases idénticas a las de *S. prolificans* están indicadas como (.) y los huecos como (-).

Las secuencias obtenidas se compararon con las de diferentes hongos filamentosos en los que esta región estaba disponible en la base de datos del Genbank. Se ha dibujado un árbol filogenético con algunos de los hongos ascomicetos filamentosos más importantes. Las secuencias han sido alineadas con todas las combinaciones posibles de pares de bases. Un reanálisis de los datos con una mayor penalización por la presencia de "gaps" o huecos, no alteró significativamente la topología del árbol. Este análisis se empleó para verificar que *S. prolificans*, del que no se conoce estado sexual, está muy próximamente relacionado con los hongos ascomicetos y sobre todo con *P. boydii* (teleomorfo de *S. apiospermum*). En el árbol filogenético *S. prolificans* se agrupa con *P. boydii* (figura 5).

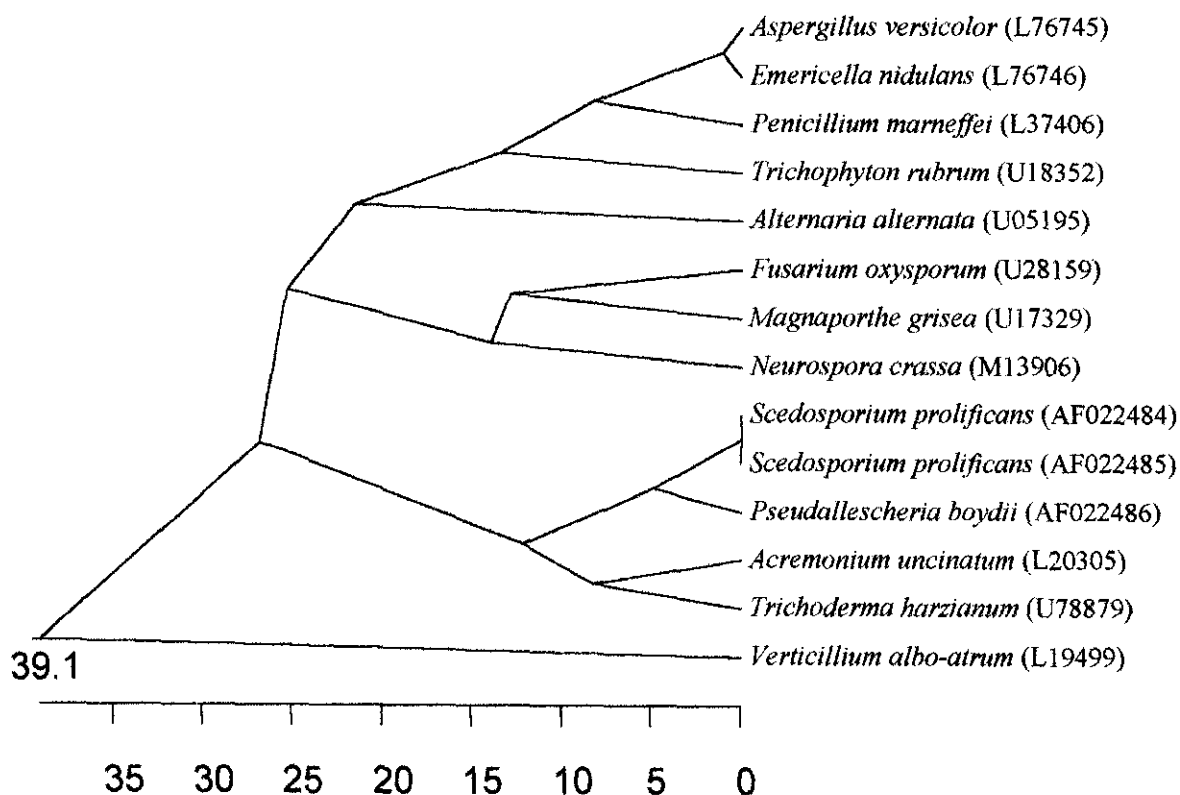


Figura 5. Árbol filogenético derivado del análisis con CLUSTAL V de las secuencias ITS1-5,8S-ITSII de *Scedosporium* sp. y varios hongos filamentosos. La escala debajo del árbol mide la distancia entre secuencias. Los números de acceso del Genbank están indicados entre paréntesis.

2. ANALISIS DE LA INTERACCION DE LOS ANTIFUNGICOS CON *S. prolificans*

2.1. LA RESISTENCIA A ANTIFUNGICOS DE *S. prolificans*

El objetivo de este apartado es analizar la resistencia “intrínseca” de *S. prolificans* a los antifúngicos empleando diferentes técnicas.

2.1.1. Técnica de microdilución

Los resultados de la técnica de microdilución se recogen en la Tabla 8. Se ensayaron todas las cepas de *S. prolificans* (Tabla 2 de Materiales 1.3.) frente a los antifúngicos más empleados. También se incluyó la cepa control de *P. variotii* (Tabla 3 de Materiales 1.3.) y, como comparación, las cepas de *S. apiospermum* (Tabla 1 de Materiales 1.3.).

Tabla 8. CMI's por la técnica de microdilución.

CMI (µg/ml)	Especies (n° de cepas ^a)		
	<i>S. prolificans</i> (22)	<i>S. apiospermum</i> (2)	<i>P. variotii</i> (1)
Anfotericina B	>16	4->16	0,25-1
Nistatina	>16	>16	8-16
5-Fluorocitosina	>128	>128	128
Fluconazol	>128	>128	4-16
Itraconazol	>16	4	0,25-0,5
Ketoconazol	128	4	<0,25
Miconazol	>128	0,5	<0,25
Voriconazol	8-32	0,5-2	<0,25

^a El origen de las cepas se detalla en las Tablas 1, 2 y 3 de Materiales 1.3.

Para el resto de las pruebas realizadas, se escogió la cepa tipo de *S. prolificans*.

El dato más significativo es la resistencia a anfotericina B. Se ha determinado por microdilución la CMI exacta de anfotericina B, que es 100 µg/ml. También se calculó por microdilución la CMI de cicloheximida, que es 50 µg/ml.

2.1.2. Curvas de mortalidad con anfotericina B

Las curvas de muerte se han realizado con la CMI (100 $\mu\text{g/ml}$) y concentraciones decimales subinhibitorias (10, 1 y 0,1 $\mu\text{g/ml}$). El resultado se expone en la figura 6 donde cada punto representa la media de tres experimentos diferentes en cada concentración.

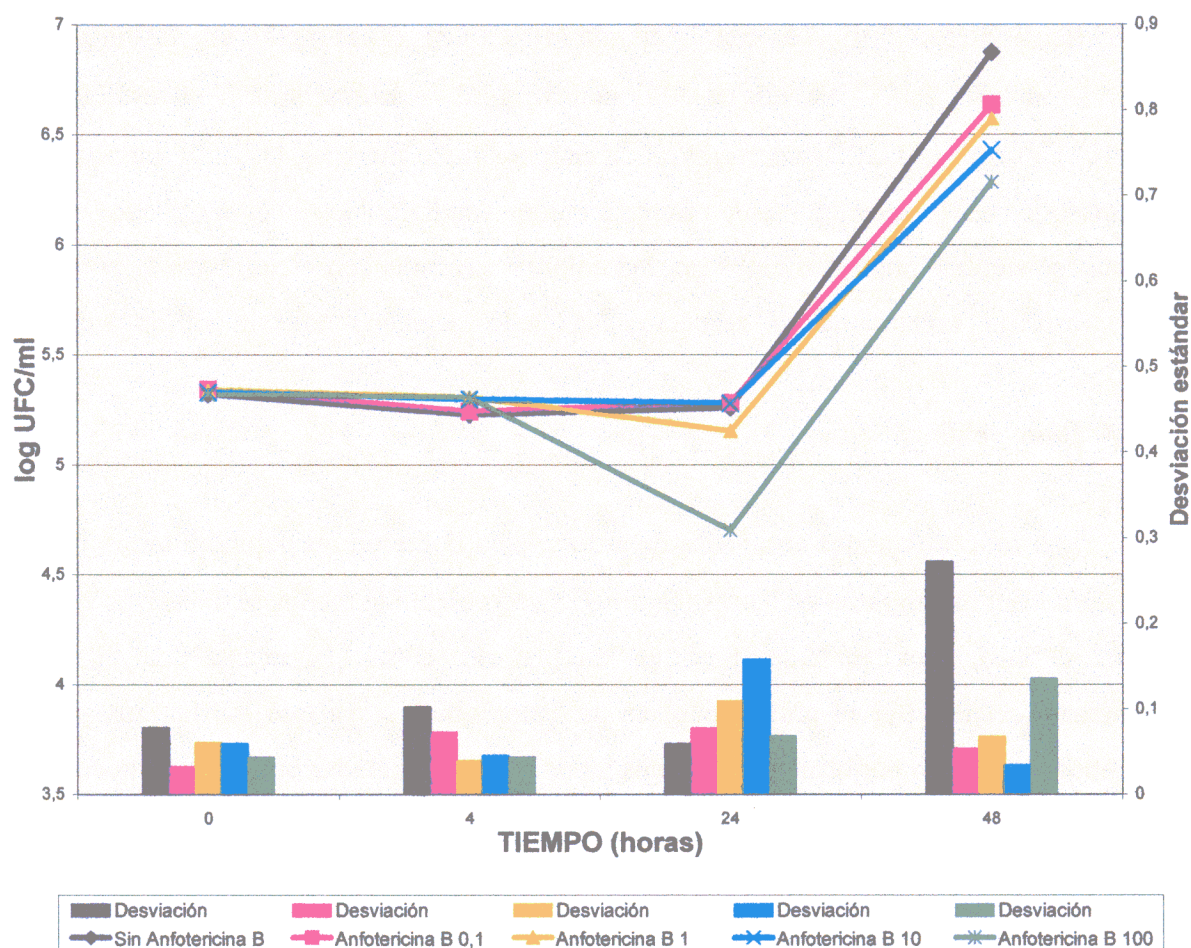


Figura 6. Curvas promedio de mortalidad de *S. prolificans* (cepa tipo) con diferentes concentraciones de anfotericina B ($\mu\text{g/ml}$). En el diagrama de barras del segundo eje de ordenadas se representan las desviaciones estándar de las UFC/ml.

No se observa ninguna acción especialmente significativa de la anfotericina B. Sólo se encuentra un efecto a la concentración superior (100 $\mu\text{g/ml}$) y a tiempos altos (24 h) donde el recuento de UFC/ml disminuye casi 1 logaritmo. La desviación es mayor a tiempos más elevados. En los tiempos menores el hongo se encuentra en los estados iniciales de crecimiento, es decir las esporas empiezan a germinar. A tiempos mayores

(24-48 h) predominan las hifas y los recuentos de colonias resultan más difíciles de realizar y se cometen más errores.

2.1.3. Eficiencia de plaqueo

La eficiencia de plaqueo se ha medido a una concentración subinhibitoria de anfotericina B (5 µg/ml) y de cicloheximida (10 µg/ml). En el medio sin antifúngico se obtuvieron $1,5-1,7 \cdot 10^6$ UFC/ml; en APD con 5 µg/ml de anfotericina B el resultado fue $1,6 \cdot 10^6$ UFC/ml y en APD con 10 µg/ml de cicloheximida fue $1 \cdot 10^6$ UFC/ml. La acción de la anfotericina B y la cicloheximida frente a colonias individuales de *S. proliferans* es nula a estas concentraciones. Sin embargo, las colonias crecidas con cicloheximida presentan un retraso en el crecimiento con respecto a las que lo hacen en medio sin antifúngico.

2.1.4. Daño celular

Las concentraciones ensayadas de anfotericina B fueron las subinhibitorias 10, 1 y 0,1 µg/ml. En el diagrama de barras (figura 7) se representa la media de 4 ensayos con sus barras de error. Los resultados hay que interpretarlos como el porcentaje de hifas que resultan afectadas por el antifúngico; es un valor relativo, ya que los hongos pueden continuar creciendo por otros mecanismos y por hifas no afectadas por el antifúngico.

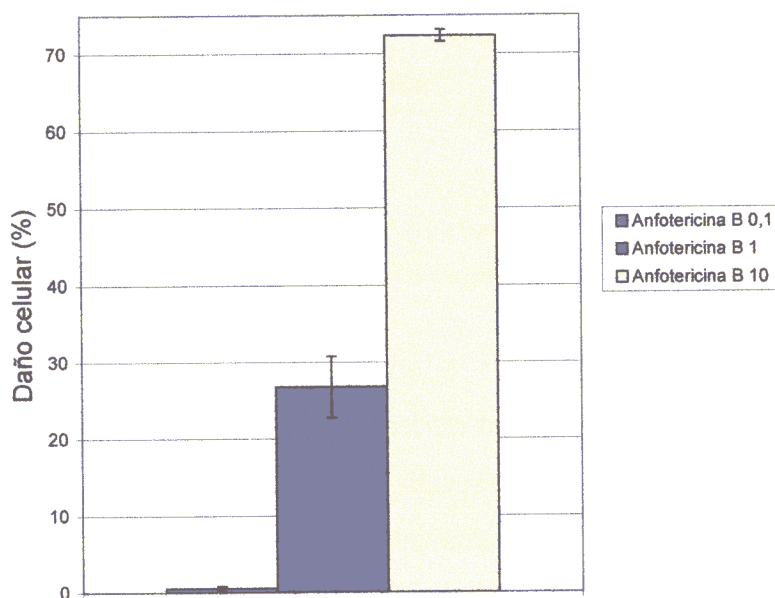


Figura 7. Daño celular producido por la anfotericina B (a las concentraciones 0,1, 1 y 10 µg/ml) sobre *S. proliferans* (cepa tipo). Las barras de error representan la desviación estándar de los 4 ensayos.

A la concentración más baja (0,1 µg/ml) el daño celular sobre *S. proliferans* no llega al 0,5%. Sorprendentemente, el porcentaje de hifas dañadas por la acción de la anfotericina B fue bastante elevado, si consideramos su resistencia, a concentraciones relativamente bajas (1 µg/ml). Hay que destacar que el error cometido en las concentraciones bajas es más elevado (figura 7); esto puede deberse a que las hifas no se agregan y se arrastra mucho micelio en los lavados.

2.2. ALTERNATIVAS AL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA: NUEVOS COMPUESTOS O COMBINACIONES

La búsqueda de compuestos o de combinaciones que produjeran algún efecto sobre el crecimiento de *S. proliferans* se ha realizado con diferentes procedimientos.

2.2.1. Prueba rápida por macrodilución

Se ha realizado una prueba preliminar por la técnica de macrodilución. Se ensaya la actividad de los antimicrobianos por separado a concentraciones de 0,1, 1, 10 y 100 µg/ml. En algún caso en el que a 100 µg/ml no hay inhibición se han probado concentraciones más altas. En la Tabla 9 se recoge el porcentaje de inhibición, determinado visualmente, que producen todos los antimicrobianos ensayados.

Se escogen las concentraciones subinhibitorias más altas, para probarlas en combinación, como se detalla en la Tabla 10. Siempre se intentó ensayar la combinación de anfotericina B, a una concentración de 10 µg/ml, con el resto de compuestos. Se encontró que la combinación de anfotericina B (a 10 µg/ml) y cicloheximida (a 10 µg/ml) resulta inhibitoria para el crecimiento (macroscópico) de *S. proliferans*.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición^a de *S. proliferans* medido por macrodilución.

	Concentración (µg/ml)						
	0,1	1	10	100	200	500	1000
Anfotericina B				80%	100%		
Cicloheximida				100%			
5-Fluorocitosina							
Fluconazol							
Ketoconazol							
Itraconazol							
Miconazol							
Higromicina B				100%			
Tetraciclina						20%	
Minociclina				20%	20%	20%	
Rifampicina							
Nikomicina			10%	20%			
Cerulenina			95%	100%			
Triciclazol					100%		
Pneumocandina L-733-560			80%	100%			
Cloranfenicol							30%
Gentamicina							
Eritromicina							
Paromomicina				35%			
Sordarina GW 471552A							

^aLos antimicrobianos sin ningún porcentaje no resultaron inhibitorios a ninguna de las concentraciones.

Tabla 10. Combinaciones de antimicrobianos^a ensayados con *S. proliferans* por macrodilución^b.

	AB	FZ	5FC	KZ	IZ	MZ
Cicloheximida	+	-	-	-	-	+/-
Itraconazol	-					
Higromicina B	+/-					
Tetraciclina	-					
Minociclina	-					
Rifampicina	-					
Nikomicina	-					
Cerulenina	-					
Triciclazol	+/-					
Pneumocandina	-					
Cloranfenicol	-					
Gentamicina	-					
Eritromicina	-					
Paromomicina	-					
Sordarina	-					

^aAB, anfotericina B, 5-FC, 5-fluorocitosina; FZ, fluconazol; IZ, itraconazol; KZ, ketoconazol; MZ, miconazol.

^b+ inhibición total del crecimiento. +/- pequeña inhibición. - no hay inhibición del crecimiento. Los cuadros en blanco indican que no fueron ensayadas.

Aquellas combinaciones inhibitorias o dudosas fueron seleccionadas para realizar el siguiente ensayo.

2.2.2. Método del tablero de ajedrez

En los siguientes isobologramas se representan las combinaciones de antimicrobianos que se ensayaron con la cepa tipo de *S. proliferans*.

La CIF para la combinación cicloheximida-anfotericina B es 0,03, lo que indica que es sinérgica (figura 8). Esta combinación se repitió tres veces para asegurarse de la fiabilidad de los resultados.

Para la combinación higromicina B-anfotericina B, el cálculo de la CIF es muy complicado debido a la forma sinusoidal de la curva obtenida (figura 9). En las gráficas de triclazol-anfotericina B (figura 10) y cicloheximida-miconazol (figura 11) se han tomado como valores de las CMI de triclazol y miconazol 400 y 200 µg/ml, respectivamente, aunque en ambos casos es mayor. Esto impide en los dos casos determinar la CIF de las combinaciones.

Dadas las dificultades para calcular la CIF, se ha tomado como resultado de la combinación la forma de la curva representada. Así, la única combinación que da lugar realmente a sinergismo es cicloheximida-anfotericina B.

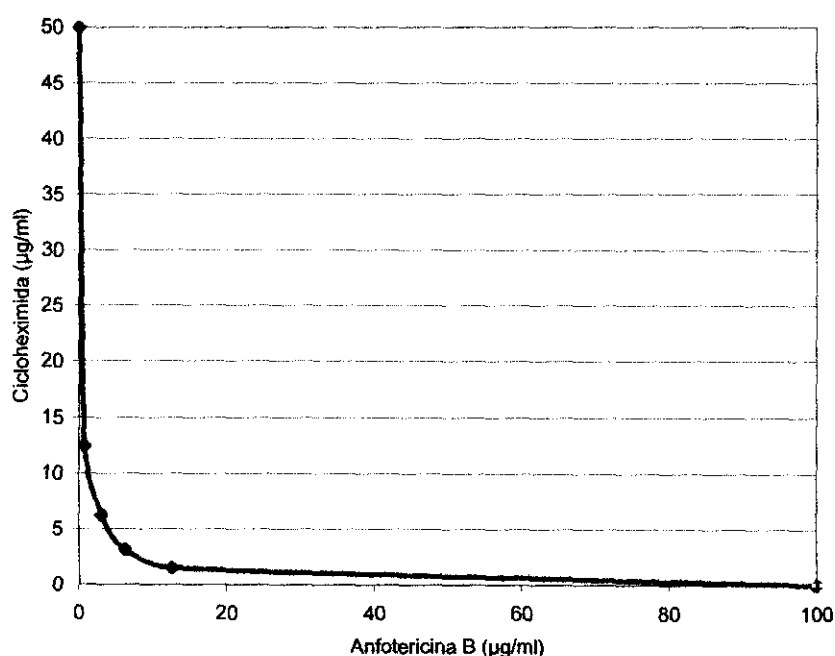


Figura 8. Curva de sinergismo anfotericina B-cicloheximida realizada con la cepa tipo de *S. proliferans*

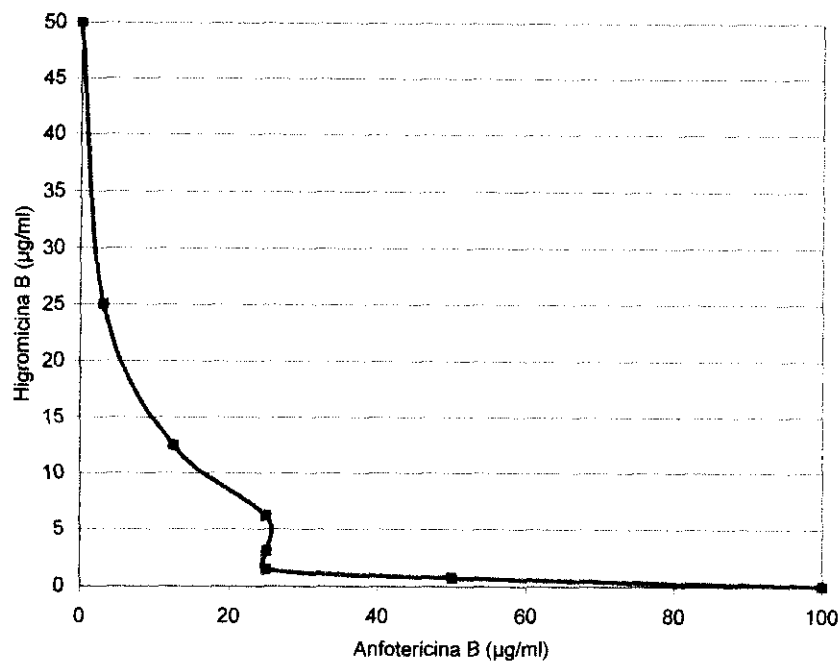


Figura 9 Curva de sinergismo anfotericina B-higromicina B realizada con la cepa tipo de *S. proliferans*

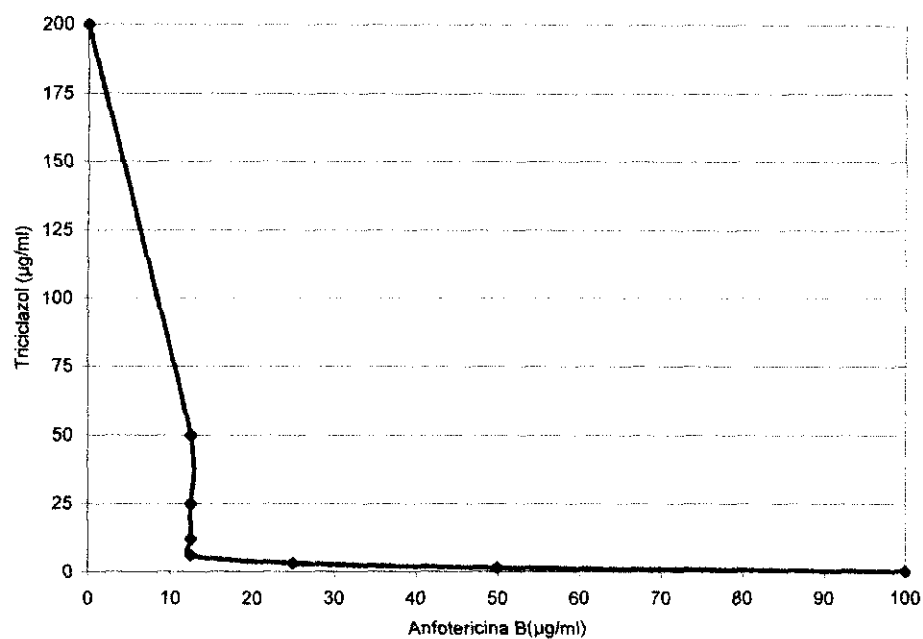


Figura 10. Curva de sinergismo anfotericina B-triciclazol realizada con la cepa tipo de *S. proliferans*

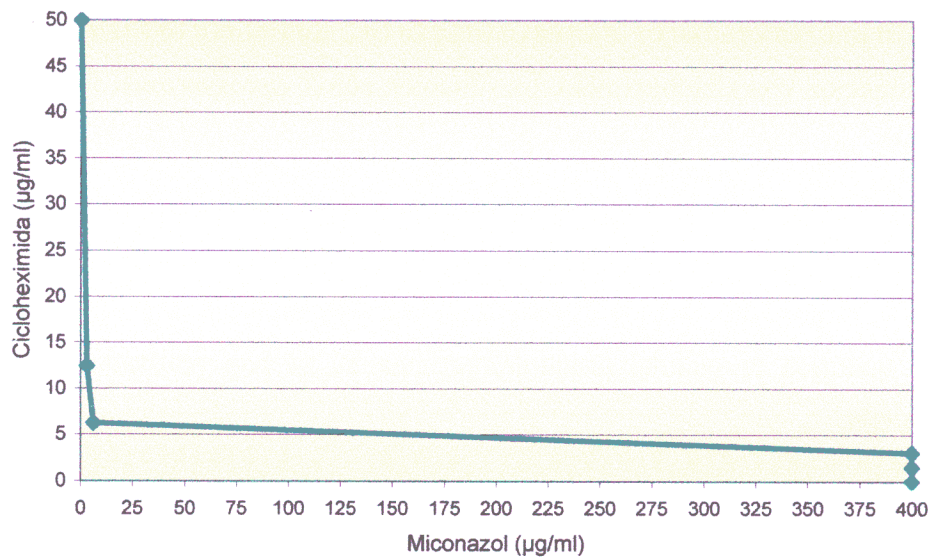


Figura 11. Curva de sinergismo miconazol-cicloheximida realizada con la cepa tipo de *S. proliferans*

Debido al interés del resultado de la combinación cicloheximida-anfotericina B, se ha ensayado también por el método del tablero de ajedrez la combinación de cicloheximida con otro antifúngico poliénico (nistatina). Este ensayo se repitió tres veces, obteniéndose resultados confusos. No se puede concluir que esta combinación sea sinérgica para *S. proliferans*.

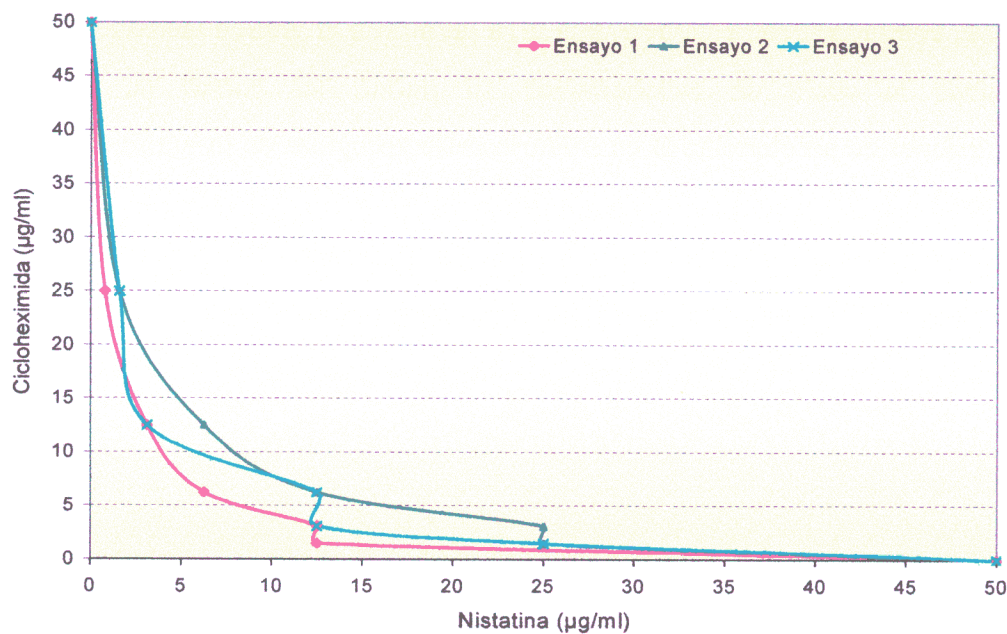


Figura 12. Curvas de sinergismo nistatina-cicloheximida realizadas con la cepa tipo de *S. proliferans*

También se ensayó la combinación cicloheximida-anfotericina B con *P. variotii* y *S. apiospermum*. Con *P. variotii* se encontró que la inhibición producida por la anfotericina B a la concentración mínima ensayada (0,1 µg/ml) era idéntica a la producida por su combinación con cicloheximida. La situación con *S. apiospermum* fue diferente, ya que se obtuvo un claro antagonismo con la combinación anfotericina B-cicloheximida. Además, la CMI de cicloheximida en el caso de *S. apiospermum* es distinta en función de la cepa.

Debido a que con *S. prolificans* la única combinación que ha resultado ser claramente sinérgica es cicloheximida-anfotericina B, se han realizado las siguientes pruebas con ella.

2.2.3. Curvas de mortalidad

Las curvas de muerte con dos antifúngicos se realizan tomando una concentración subinhibitoria para uno de ellos (Métodos 2.4.), en este caso la cicloheximida a una concentración de 10 µg/ml. Los ensayos también se realizaron por triplicado. En la figura 13 se presentan los gráficos con las medias de los tres experimentos y las desviaciones estándar.

Como se puede comprobar en el gráfico de las curvas de mortalidad, existe una bajada de 1 logaritmo en las UFC/ml a las concentraciones de anfotericina B de 10 y 100 µg/ml, combinada con cicloheximida a 10 µg/ml. En el gráfico también se encuentra representada la curva de cicloheximida 10 µg/ml; las curvas de las diversas concentraciones de anfotericina B en solitario están recogidas en la gráfica (figura 6) de Resultados 2.1.2.

Las desviaciones estándar son muy pequeñas (alrededor de 0,1) para casi todos los puntos, excepto a las 48 h en que la filamentación hace que aumenten.

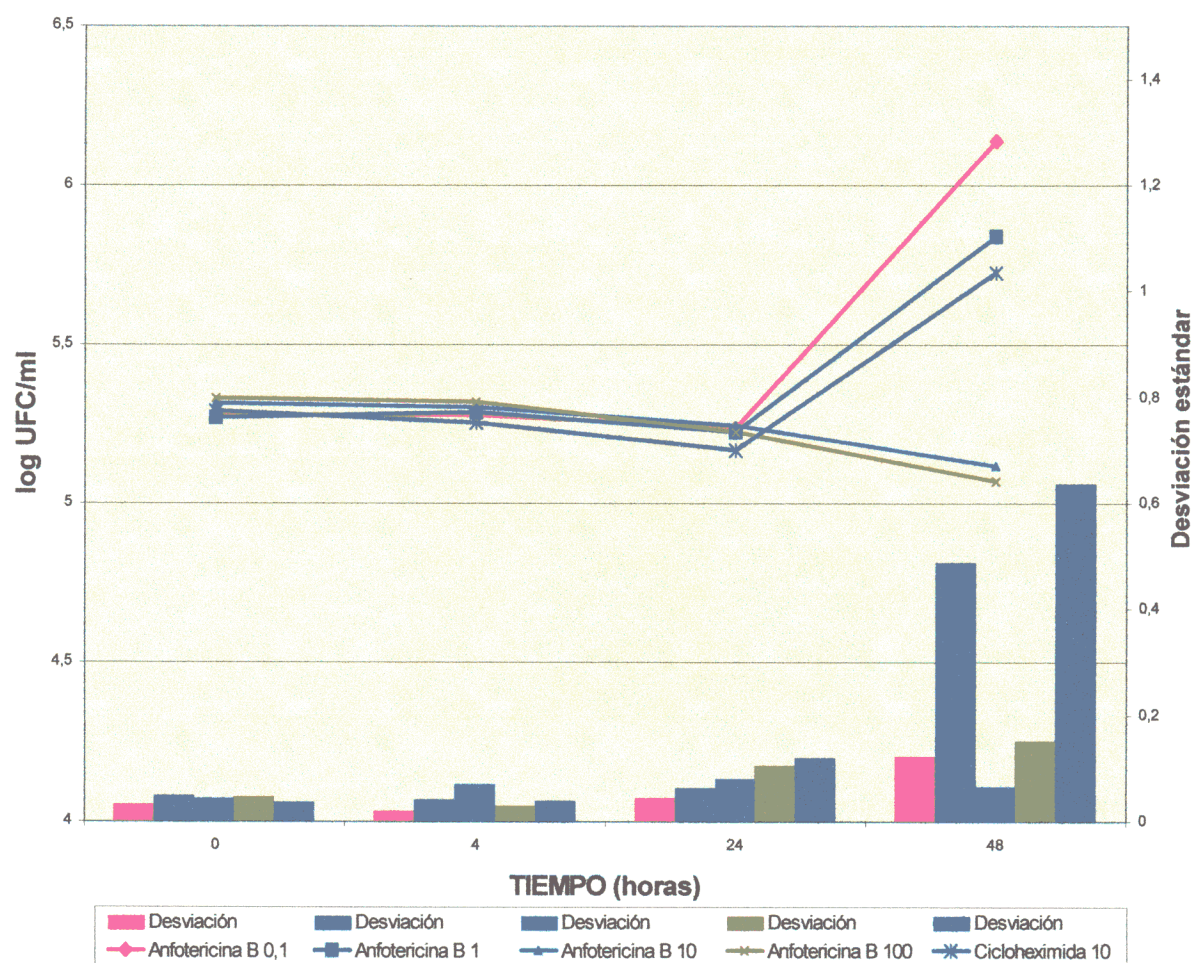


Figura 13. Curvas de muerte promedio de la cepa tipo de *S. proliferans* con ciclohexitida 10 µg/ml y diferentes concentraciones de anfotericina B. En el diagrama de barras del segundo eje de ordenadas se representan las desviaciones estándar de las UFC/ml. La única curva realizada sin anfotericina B es la curva control de ciclohexitida 10 µg/ml.

2.2.4. Daño celular producido por dos antifúngicos

Primero se realizó el cálculo del daño celular producido sólo por la ciclohexitida, ya que con la anfotericina B ya se había realizado (Resultados 2.1.4). Las concentraciones ensayadas de ciclohexitida fueron 10, 1 y 0,1 µg/ml (figura 14).

Las combinaciones que se eligieron fueron aquellas en las que cada antifúngico por separado producía un daño celular inferior al 50 % (Métodos 2.5.). Los resultados se reflejan en los diagramas de barras de la figura 15. Todas las combinaciones producen más daño celular que los antifúngicos por separado. La combinación de ciclohexitida a 1 µg/ml y anfotericina B a 1 µg/ml es la que produce un mayor daño celular (51%); mientras que ambos antifúngicos en solitario a la misma concentración producían un daño

celular próximo al 28%. La desviación de las combinaciones es igual a la de las mismas concentraciones de los antifúngicos por separado.

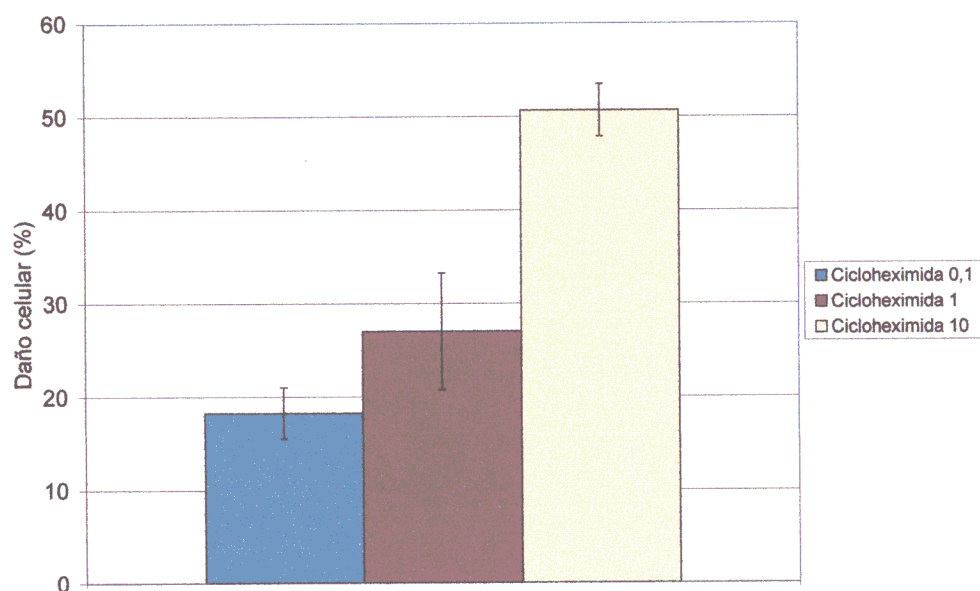


Figura 14. Daño celular producido por la cicloheximida (a las concentraciones de 0,1, 1 y 10 µg/ml) sobre *S. proliferans* (cepa tipo). Las barras de error representan la desviación estándar de 4 ensayos.

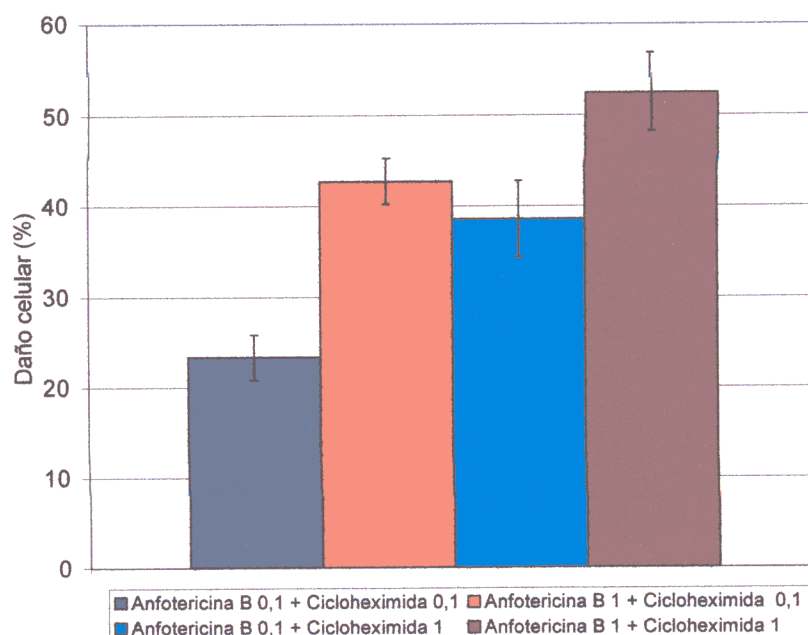


Figura 15. Daño celular producido por la combinación cicloheximida-anfoterina B (ambos a concentraciones de 0,1 y 1 µg/ml) sobre *S. proliferans* (cepa tipo). Las barras de error representan la desviación estándar de 4 ensayos.

3. ANALISIS DE LA VIRULENCIA DE *S. prolificans*

3.1. SENSIBILIDAD A CICLOHEXIMIDA

La sensibilidad a cicloheximida de *S. prolificans* se determinó por varios métodos distintos y con varias cepas diferentes. Las cepas empleadas fueron CBS 467.74 (cepa tipo), ATCC64913 (cepa ex-tipo) y NCPF 2884 (Tabla 2 de Materiales 1.3.). Representan tipos de aislamientos distintos: ambiental (la cepa tipo) y clínico (las otras dos). La concentración mínima inhibitoria de cicloheximida fue la misma con las tres cepas. Por las técnicas de macrodilución y dilución en agar se obtuvo una CMI para la cicloheximida de 100 µg/ml. Con la técnica de microdilución, la CMI de cicloheximida es de 50 µg/ml.

3.2. TERMORRESISTENCIA

Con la cepa de referencia NCPF 2884 se compararon varios cultivos en placas de agar Sabouraud y agar patata (APD) a distintas temperaturas (25, 30 y 35°C). Se encontró (Tabla 11) que la tasa de crecimiento a 35°C era mayor.

Tabla 11. Crecimiento de *S. prolificans* (NCPF 2884) en agar Sab a diferentes temperaturas

Temperatura	Ø de la colonia a los 10 días
25°C	34 cm
30°C	39 cm
35°C	52 cm

3.3. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Se evaluaron las velocidades de crecimiento de las cepas de *S. prolificans* de diferentes orígenes. Se tomaron las tres cepas de referencia (Tabla 2 de Materiales 1.3.), representantes de los dos nichos ecológicos. La tasa de crecimiento se estudió midiendo los diámetros de las colonias creciendo en placas de APD a 30°C. En la figura 16 se muestra la comparación de las velocidades de crecimiento de las distintas cepas de diferentes orígenes. Prácticamente no se observan diferencias entre ellas.

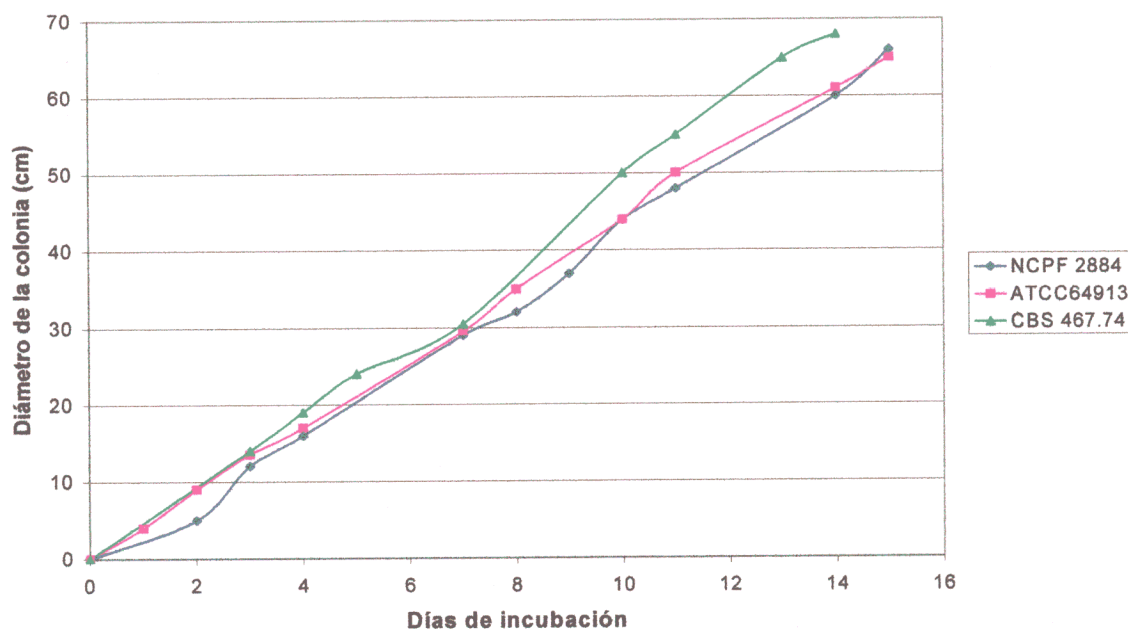


Figura 16. Crecimiento de diferentes cepas de *S. prolificans* en APD a 30°C

3.4. DIMORFISMO

El dimorfismo es una de las causas de virulencia mejor conocidas de algunos hongos patógenos humanos. Por este motivo se ha intentado inducir, con una cepa de origen clínico (NCPF 2884), la transición a una fase levaduriforme. La metodología aplicada consistió en crecer la cepa a 35°C en distintos medios de cultivo como “agar para la conversión de *Histoplasma* a levadura”, Czapek-Dox, Borrelli, corazón y cerebro, maíz, avena y extracto de malta (algunos de los cuales son reconocidos como medios de transición de fase). Se realizaron hasta cinco subcultivos en los mismos medios, y se observaron macro y microscópicamente. No se consiguió, en ningún caso, vislumbrar células de *S. prolificans* con crecimiento levaduriforme.

3.5. SINTESIS DE MELANINA

Para comprobar el tipo de melanina sintetizada por *S. prolificans* se cultivó la cepa tipo en APD en presencia de dos inhibidores distintos de la síntesis de melanina: el triciclazol (interrumpe la síntesis de melanina tipo dihidroxinaftaleno) y la cerulenina (inhibe también la síntesis de melanina tipo dihidroxinaftaleno, pero en el comienzo de la ruta biosintética). La técnica empleada ha sido la de dilución en agar. Se probaron las siguientes concentraciones finales de los inhibidores: 100, 10, 1 y 0,1 µg/ml. En el caso del triciclazol se observó una pérdida de la pigmentación gris-verdosa característica de *S. prolificans* apareciendo las colonias de color marrón claro. Esta pérdida de “color” aumentaba a la vez que lo hacía la concentración de triciclazol, y al cultivar la cepa en ausencia del inhibidor se recuperaba el color original. Con la cerulenina se inhibía el crecimiento a las concentraciones de 100 y 10 µg/ml. A las concentraciones en las que crecía el hongo, no se encontró diferencia del color original gris-verdoso.

El estudio preliminar de la virulencia y la síntesis de melanina se desarrolló con los mutantes albinos obtenidos por irradiación con luz UV (Resultados 5.1.). Además, se han realizado diversas pruebas de sensibilidad con los inhibidores de la síntesis de melanina, solos y en combinación con otros antimicrobianos, frente a la cepa tipo de *S. prolificans* (Resultados 2.2.).

4. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *S. proliferans*

4.1. PUESTA A PUNTO

4.1.1. Tipificabilidad y poder de discriminación

RAPDs. Para poner a punto la técnica de RAPD con *S. proliferans*, se diseñaron 10 iniciadores de secuencias aleatorias y de acuerdo con las restricciones del método de RAPDs (Williams *et al.*, 1993); es decir, no contienen secuencias palindrómicas, tienen una composición de G + C entre 50 y 80% y son de 10 dNTPs de longitud. Dichos iniciadores fueron probados, en reacciones de RAPD separadas, con DNA genómico de 5 cepas de *S. proliferans* procedentes de diferentes provincias españolas (cepas NCPF 2884 y CNMM 272, 209, 611 y 425 de la Tabla 2 en Materiales 1.3.). Ocho de ellos dieron lugar a un número demasiado pequeño de fragmentos (1-4) o a fragmentos del mismo tamaño con DNAs de las cinco cepas. En la figura 17 se muestran, como ejemplo, los patrones obtenidos en las reacciones de RAPD con la cepa NCPF 2884 y 5 de los iniciadores ensayados. Los iniciadores GC70 y GC80 produjeron patrones claros que diferenciaban cepas de distintos orígenes geográficos. En la figura 19 se observan los patrones resultantes de las cinco cepas con GC70 y GC80. Las secuencias de estos iniciadores se precisan en la Tabla 4 de Materiales 3.3.

“PCR-fingerprinting”. Esta técnica fue ensayada con la secuencia central del fago M13 como iniciador único. La secuencia del oligonucleótido M13 se detalla en la Tabla 4 de Materiales 3.3. Para la puesta a punto de la tipificación con esta técnica se eligieron las mismas cinco cepas de *S. proliferans* que se utilizaron con los RAPDs. El perfil electroforético obtenido por “PCR-fingerprinting” con cada cepa fue también diferente. En la figura 20 se presentan los perfiles electroforéticos de las cinco cepas, junto con otras, obtenidos con el iniciador M13.

Los perfiles electroforéticos reflejados en las figuras 19 y 20 demuestran que:

- 1) Los tres iniciadores GC70, GC80 y M13, dieron lugar a perfiles claros con todas las cepas analizadas.

- 2) Los patrones de amplificación de las 5 cepas son siempre diferentes, cualquiera que sea el iniciador empleado.

4.1.2. Reproducibilidad

a) Para estudiar la reproducibilidad de ambas técnicas se realizaron dos preparaciones de DNA diferentes de la cepa de referencia NCPF 2884, más otras cuatro cepas (CNMM 272, 324, 323 y 322), que fueron incluidas en varios experimentos consecutivos. Todas ellas originaron patrones de PCR reproducibles e idénticos. Aunque algunos fragmentos fueron a veces menos intensos, sus posiciones y su presencia o ausencia, fueron siempre estables. Pequeñas modificaciones en las condiciones de reacción pueden explicar estas variaciones ocasionales en la intensidad de los amplificados. Estas leves alteraciones no afectaron a la capacidad de diferenciar cepas en el conjunto de la población. En la figura 18 se presentan los patrones de 4 cepas con dos preparaciones de DNA extraído a partir de dos cultivos monoespora independientes.

Los patrones también son reproducibles cuando se realizan varias electroforesis con los mismos amplificados.

b) Igualmente, se intentó determinar si había variaciones en los perfiles electroforéticos a lo largo de los años. Se repitieron las reacciones de amplificación con el DNA extraído anteriormente de una cepa (CNMM 272). En el caso de los RAPDs con el iniciador GC70 se observó una disminución del número de fragmentos (de 8 a 5 fragmentos). Los perfiles con el iniciador GC80 presentaron una variabilidad más acusada, ya que, a pesar de que permanecen fragmentos conservados, otros varían notablemente en su tamaño.

La técnica de “PCR-fingerprinting” con el iniciador M13 presenta una mayor conservación en el tamaño y número de fragmentos; la variación de los patrones se encuentra en el rango de tamaños entre 2,5 y 4 kb. Se puede observar esta diferencia en las figuras 20 y 22 (hay menos fragmentos entre 2,5-4 kb en la figura 22).

Todos los datos indican la necesidad de realizar una nueva puesta a punto de las técnicas de tipado por PCR en cada ocasión en que se vayan a emplear. No obstante, la “mejor” reproducibilidad en el tiempo se consiguió con la técnica de “PCR-fingerprinting”.

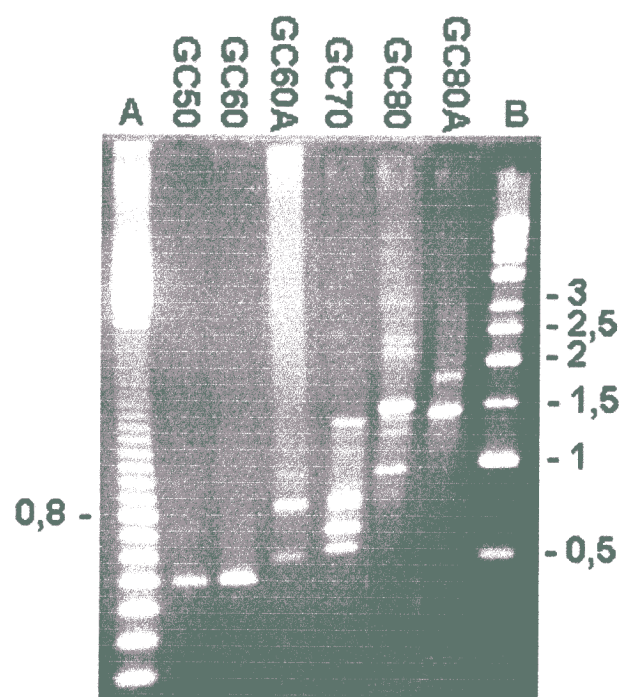


Figura 17. RAPDs de la cepa control de *S. proliferans* NCPF 2884, con diferentes iniciadores. El número que sigue a las letras GC indica el porcentaje de G + C que presentan los oligonucleótidos diseñados. Los que presentan una A después del número difieren de los que no la tienen en que se ha sustituido una T por A en el extremo 3' de la secuencia. Pocillos A y B, marcadores de peso molecular "100 bp ladder" y "kilobase ladder", respectivamente. Los tamaños moleculares se indican en kilobases.

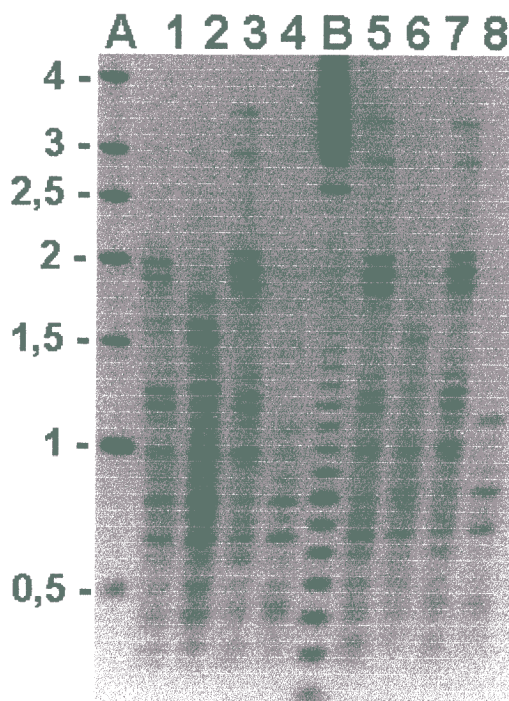


Figura 18. Reproducibilidad de la técnica de "PCR-fingerprinting" con 4 cepas de *S. proliferans*. Las calles 1-4 y 5-8 presentan la primera y segunda realización de la PCR con el iniciador M13. El orden de las cepas es el mismo en las dos series: CNMM 272, 324, 323 y 322. Los pocillos A y B son los marcadores de peso molecular: (A) "kilobase pair ladder" y (B) "100 bp ladder". Se ha representado el negativo de la fotografía.

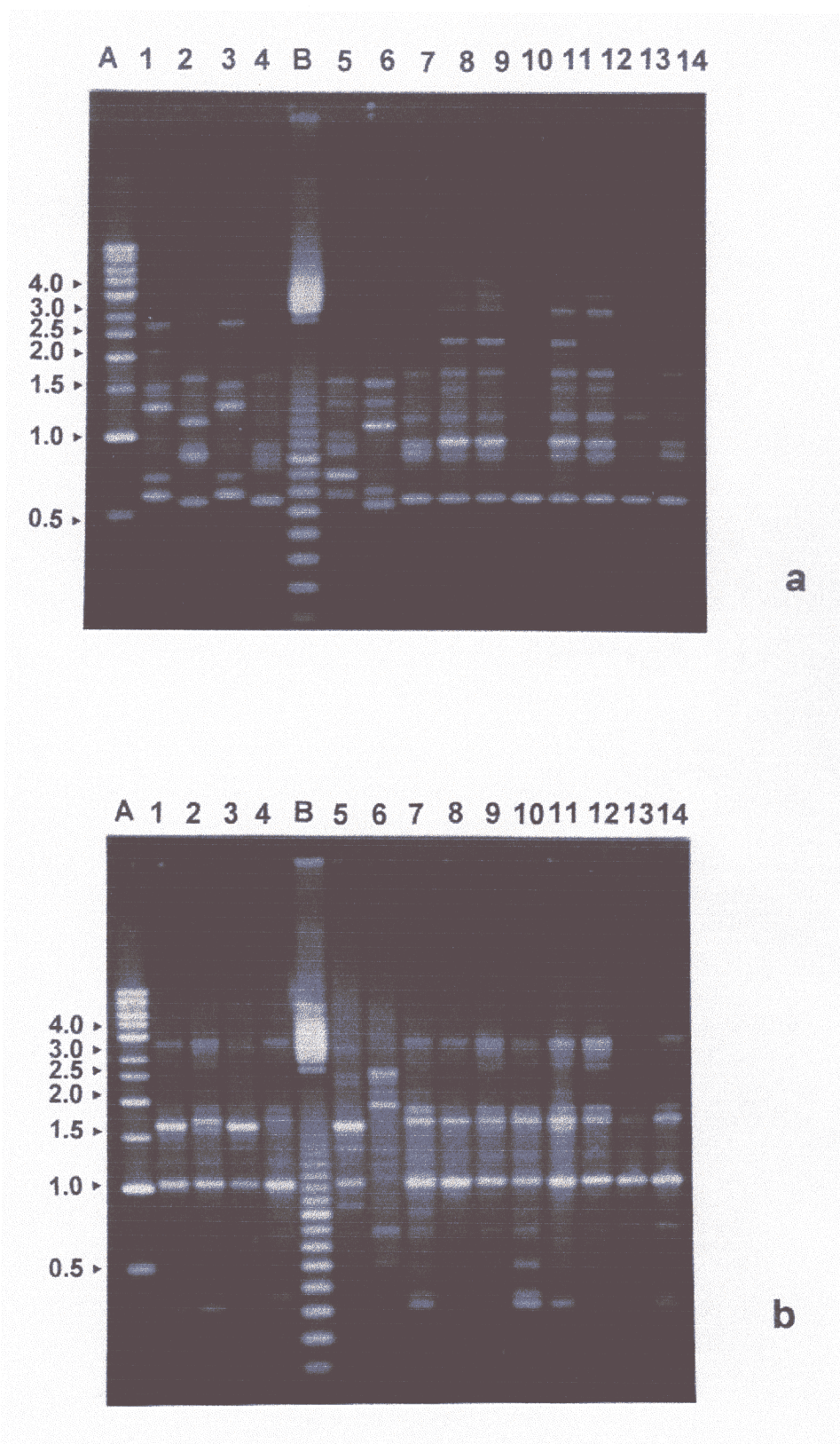


Figura 19. Patrones de RAPD de 14 cepas de *S. proliferans* generados con los iniciadores GC70 (a) y GC80 (b). Los pocillos A y B son los marcadores de tamaño molecular [A: “kilobase ladder”, con los tamaños en kilobases a la izquierda; B: “100 base pair ladder”]; los pocillos 1-14 son las cepas 1-14 de la Tabla 12. Los patrones resultantes se especifican en la Tabla 12.

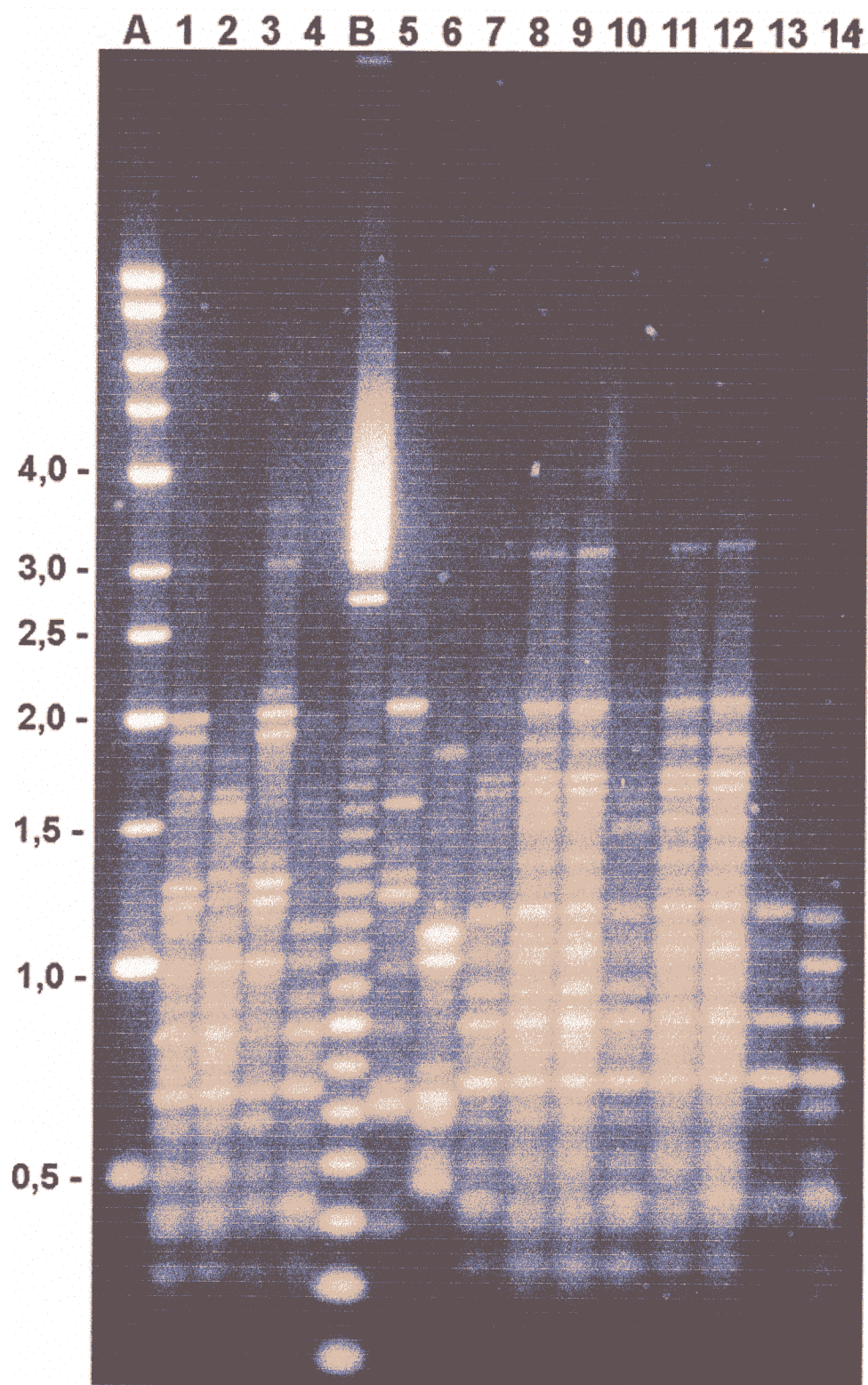


Figura 20. Perfiles moleculares de "PCR-fingerprinting" de 14 cepas de *S. prolificans* con el iniciador M13. Los pocillos A y B son los marcadores de tamaño molecular [A: "kilobase ladder", con los tamaños en kilobases a la izquierda; B: "100 base pair ladder"]; los pocillos 1-14 son las cepas 1-14 de la Tabla 12. Los patrones resultantes se especifican en la Tabla 12.

4.2. APLICACIÓN A UN BROTE DE INFECCION NOSOCOMIAL CAUSADO POR *S. prolificans* EN UNA UNIDAD DE HEMATOLOGIA

Una vez puestas a punto las técnicas de RAPD y "PCR-fingerprinting", se aplicaron a la caracterización del brote de infecciones causadas por *S. prolificans* en cuatro enfermos leucémicos descrito previamente (Alvárez *et al.*, 1995).

Como población control se tomaron todas las cepas de *S. prolificans* disponibles en aquel momento en la Unidad de Micología. En total se analizaron 10 cepas procedentes de 7 hospitales españoles, más las cuatro cepas del brote procedentes del Hospital Central de Asturias. Los resultados se recogen en la Tabla 12. Aquellas cepas que dieron patrones con fragmentos idénticos fueron consideradas como pertenecientes al mismo tipo.

Tabla 12. Patrones obtenidos por RAPD y "PCR-fingerprinting" de 14 cepas de *S. prolificans*.

Nº	Identificación ^b	Localización geográfica (hospital)	RAPD		PCR-fingerprinting M13	Tipo
			GC70	GC80		
1	CNMM 272	Oviedo (J) ^c	70-1	80-1	13-1	1
2	CNMM 324	Oviedo (J) ^c	70-2	80-2	13-2	2
3	CNMM 323	Oviedo (J) ^c	70-1	80-1	13-1	1
4	CNMM 322	Oviedo (J) ^c	70-3	80-3	13-3	3
5	NCPF 2884	Madrid (C)	70-4	80-4	13-4	4
6	CNMM 513	Madrid (D)	70-5	80-5	13-5	5
7	CNMM 571	Madrid (E)	70-6	80-6	13-6	6
8	CNMM 89	S. Sebastián (F)	70-7	80-7	13-7	7
9	CNMM 209	S. Sebastián (F)	70-8	80-2	13-7	8
10	CNMM 222	S. Sebastián (F)	70-9	80-8	13-8	9
11	CNMM 546	Baracaldo (G)	70-7	80-2	13-9	10
12	CNMM 611	Baracaldo (G)	70-10	80-9	13-9	11
13	CNMM 687	Vitoria (H)	70-6	80-10	13-10	12
14	CNMM 425	Barcelona (I)	70-6	80-11	13-11	13

a. Los números corresponden a los pocillos de los geles en las figuras 19 y 20.

b. El origen clínico y fecha de aislamiento de las cepas se detalla en Materiales 1.3 (Tabla 2).

c. Cepas del brote. Los números 1-4 corresponden a los casos clínicos 1-4, respectivamente (Alvárez *et al.*, 1995).

Los patrones obtenidos por RAPD y “PCR-fingerprinting” se muestran en las figuras 19 y 20, respectivamente.

El iniciador M13 diferencia perfectamente todas las cepas de distinto origen geográfico, aunque parece existir una mayor similitud entre cepas del mismo hospital (cepas nº 8 y 9 del hospital F y cepas nº 11 y 12 del hospital G). Con los iniciadores GC70 y GC80, resultaron iguales algunas cepas de diferentes localidades. Esto sucede, para GC70, con las cepas nº 7, 13 y 14 de los hospitales E, H e I, y con las nº 8 y 11 de los hospitales F y G. Con GC80, ocurre con las cepas nº 2, 9 y 11 de los hospitales J, F y G.

El poder discriminatorio fue muy similar para cada uno de los iniciadores: GC70 y GC80 detectan 10 y 11 tipos respectivamente, mientras que M13 detecta 11 patrones entre las 14 cepas tipificadas. Un mayor grado de discriminación se observa por combinación de los resultados de los tres iniciadores: se obtienen 13 tipos entre las 14 cepas estudiadas. Un grado de discriminación idéntico se consigue empleando cualquier pareja de los tres, pero se incluyó el tercero para confirmar los resultados.

En cuanto al resultado obtenido al analizar los perfiles moleculares de las cepas causantes del brote, tanto la “PCR-fingerprinting” como los RAPD con cualquiera de los dos iniciadores, alcanzan el mismo resultado: tres tipos moleculares entre las cuatro cepas (figuras 19 y 20). Así pues, sólo dos pacientes (1 y 3) parecen compartir una cepa similar. Los dos restantes (2 y 4) fueron, aparentemente, infectados por dos cepas distintas.

4.3. CARACTERIZACION POR “PCR-FINGERPRINTING” DE UN SEGUNDO BROTE DE INFECCION NOSOCOMIAL CAUSADO POR *S. proliferans*

Como se describe en el apartado 4.1. de puesta a punto del método, el empleo de las técnicas de tipificado por PCR al cabo del tiempo exige en cada caso una nueva estandarización. En esta segunda ocasión, se eligieron nueve cepas como grupo control (Tabla 13) para contrastar el poder discriminatorio de la técnica. Siete de ellas se obtuvieron de 7 hospitales españoles diferentes y sin ninguna relación. Las cepas de referencia CBS 467.74, ATCC 64913 y NCPF 2884 se utilizaron además como control de la reproducibilidad.

Cada cepa del grupo control produjo un tipo molecular diferente. La técnica de “PCR-fingerprinting” distinguió cepas de diferente origen geográfico (ver Tabla 13 y figura 22). Los patrones se repitieron cuando se emplearon tres preparaciones de DNA de las cepas control, así como en las diversas electroforesis de los mismos amplificados.

Un total de 6 cepas del brote fueron tipificadas con la secuencia central del fago M13 como único iniciador (figura 21 y Tabla 13). Cuatro de ellas procedían de cuatro pacientes leucémicos y dos eran muestras ambientales obtenidas del aire. Cinco de ellas tienen el mismo patrón y, por lo tanto, podrían ser iguales. Así pues, los 4 pacientes (cepas nº 1-4) compartirían una cepa similar. La primera muestra ambiental (cepa nº 5) presenta el mismo tipo molecular. La segunda (nº 6) tiene sólo una pequeña diferencia (figura 21, pocillos 5 y 6) que consiste en un fragmento de más de 1,8 kb que está ausente.

Cuando se compararon los resultados del brote y de la población control, se encontraron entre las 15 cepas estudiadas 10 genotipos. El hecho de que las cepas de *S. proliferans* de los 4 pacientes tengan el mismo perfil molecular hace pensar que se trata de una infección nosocomial. Esta sugerencia se apoya también en el aislamiento de cepas ambientales con el mismo perfil.

Tabla 13. Tipos moleculares obtenidos por "PCR-fingerprinting" de 15 cepas de *S. proliferans*.

Nº ^a	Identificación ^b	Localización geográfica (hospital)	PCR-fingerprinting M13
1	CNMM 1016	La Coruña (K) ^c	1
2	CNMM 1018	La Coruña (K) ^c	1
3	CNMM 1034	La Coruña (K) ^c	1
4	CNMM 1051	La Coruña (K) ^c	1
5	CNMM 1056	La Coruña (K) ^c	1
6	CNMM 1073	La Coruña (K) ^c	1b
7	NCPF 2884	Madrid (C)	2
8	CNMM 272	Oviedo (J)	3
9	CNMM 425	Barcelona (I)	4
10	CNMM 209	San Sebastián (F)	5
11	CNMM 611	Baracaldo (G)	6
12	ATCC 64913	Canadá (B)	7
13	CBS 467.74	Bélgica (A)	8
14	CNMM 687	Vitoria (H)	9
15	CNMM 571	Madrid (E)	10

- Los números 1-6 corresponden con los pocillos 1-6 de la figura 21. Los números 7-15 corresponden con los pocillos 1-9 de la figura 22.
- El origen clínico y fecha de aislamiento de las cepas se detalla en Materiales 1.3 (Tabla 2).
- Cepas del brote nº 2.

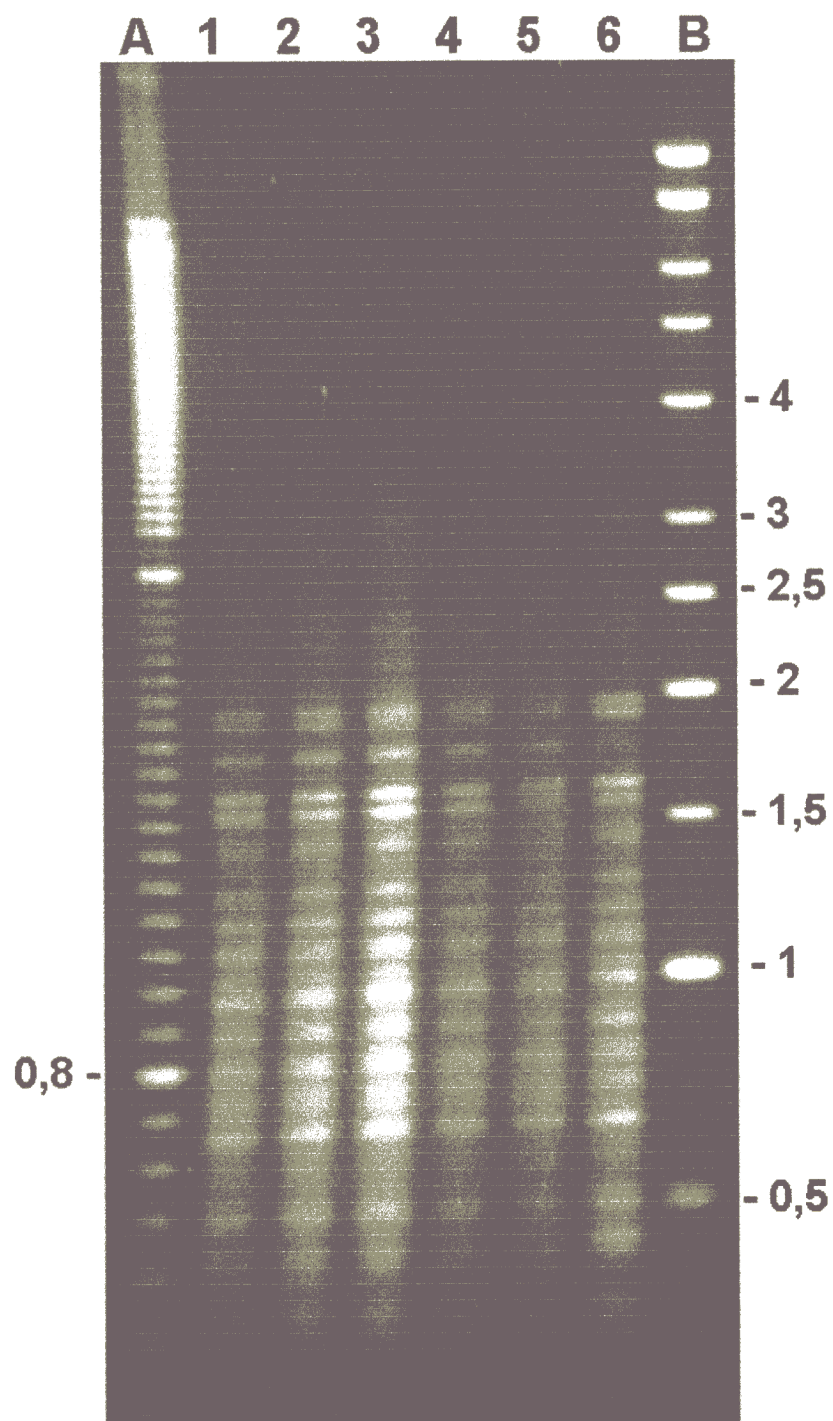


Figura 21. “PCR-fingerprinting” de las 6 cepas de *S. proliferans* del brote nosocomial n° 2. Los pocillos A y B son los marcadores de peso molecular (A: “100 bp ladder”; B: “kilobase ladder”). Los pocillos 1-6 corresponden con las cepas 1-6 de la Tabla 13. Los tamaños moleculares están indicados en kilobases.

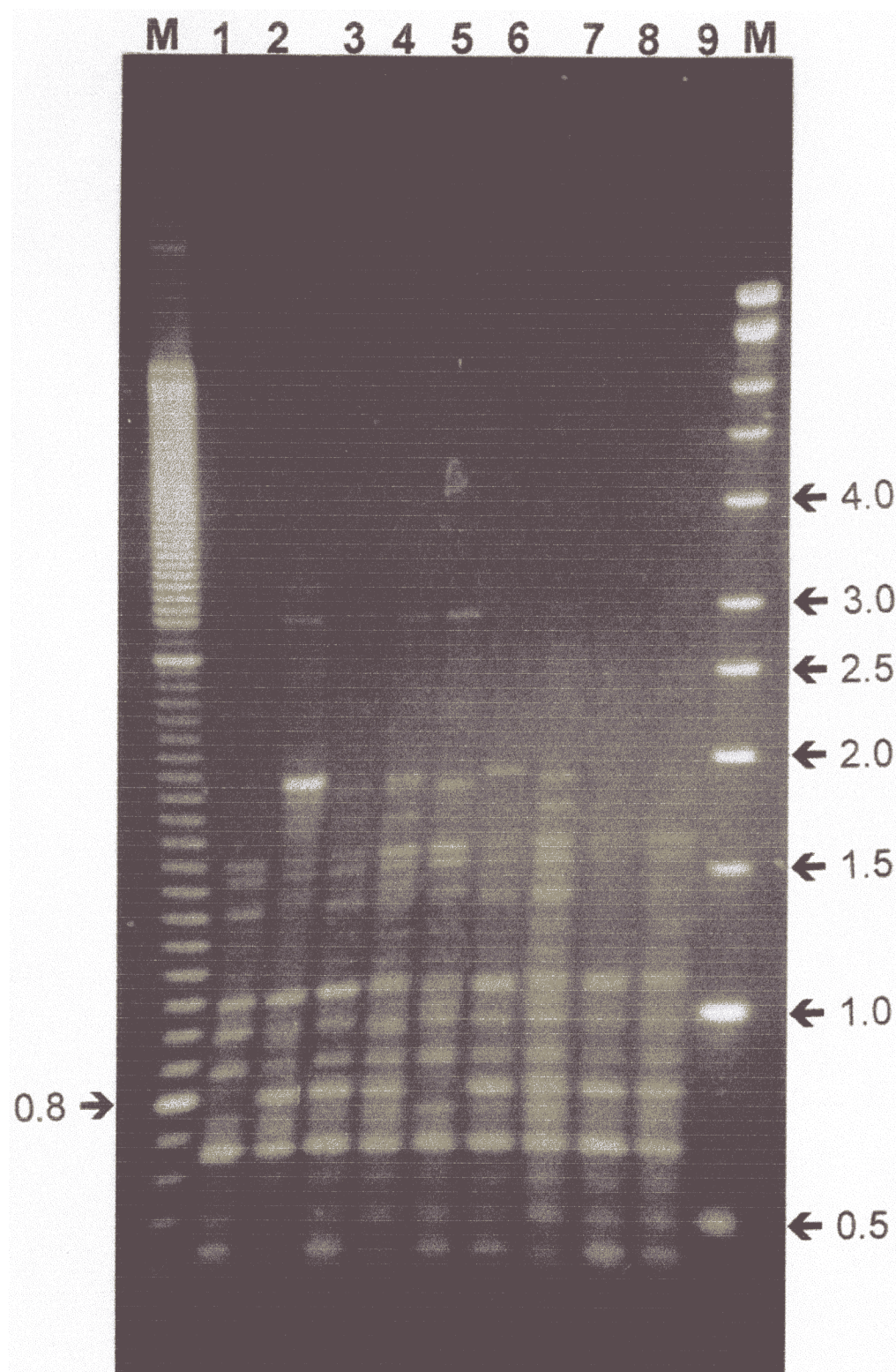


Figura 22. Caracterización genotípica de las cepas de *S. proliferans* empleadas como control en la tipificación del brote n° 2. Los patrones son los producidos con el iniciador M13. Los pocillos 1-9 corresponden a las cepas 7-15 de la Tabla 13. Los marcadores (M) son “kilobase” (derecha) y “100 bp” (izquierda). Los tamaños moleculares están indicados en kilobases.

5. INTRODUCCION AL ANALISIS GENETICO DE *S. prolificans*

5.1. MUTANTES

5.1.1. Mutantes espontáneos

5.1.1.1. Mutantes albinos.

Con el objetivo de conseguir mutantes albinos de *S. prolificans* se emplearon dos cepas, la cepa ex-tipo y la cepa tipo (Tabla 3 de Materiales 1.3.). Se siguió el procedimiento descrito en Métodos 7.1. El experimento se repitió 4 veces con ambas cepas. En todas las ocasiones el fenotipo blanco revirtió al original, obteniéndose como resultado que la tasa de obtención de mutantes espontáneos albinos es menor de 10^{-9} .

5.1.1.2. Mutantes resistentes a cicloheximida.

Se utilizaron tres cepas, la cepa ex-tipo, la cepa tipo, y la cepa NCPF 2884 (Tabla 3 de Materiales 1.3.). Previamente se calculó la CMI de cicloheximida de las tres cepas mediante la técnica de dilución en agar (APD) y a 30°C (Métodos 2.2.3.). La CMI de cicloheximida para las tres es de 100 µg/ml.

Se analizó la tasa de mutación espontánea por contaje de colonias en placas de APD con 25-200 µg/ml de cicloheximida. En los tres casos la tasa resulta ser menor de 10^{-9} .

5.1.2. Mutantes inducidos con luz UV

5.1.2.1. Curvas dosis-supervivencia

Se adjuntan las gráficas de dosis-supervivencia con luz UV de la cepa ex-tipo (figura 23) y las de la cepa tipo (figura 24) (con la cual el experimento se repitió 4 veces). La forma de las curvas es la típica que resulta al irradiar un microorganismo (Davis y Serres, 1970). La supervivencia de las esporas es inversamente proporcional al tiempo de exposición a la luz UV. Hay que destacar que a tiempos de exposición mayores o iguales a 30 s, más del 90% de las esporas son inviables.

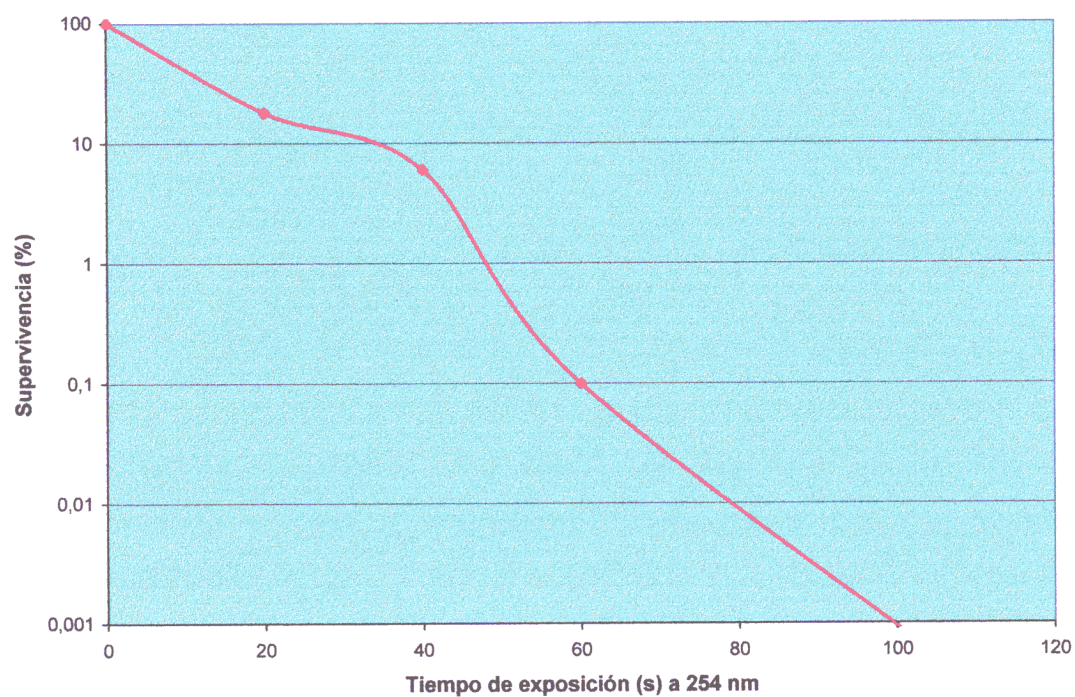


Figura 23. Curva dosis-supervivencia con luz UV de *S. proliferans* ATCC64913

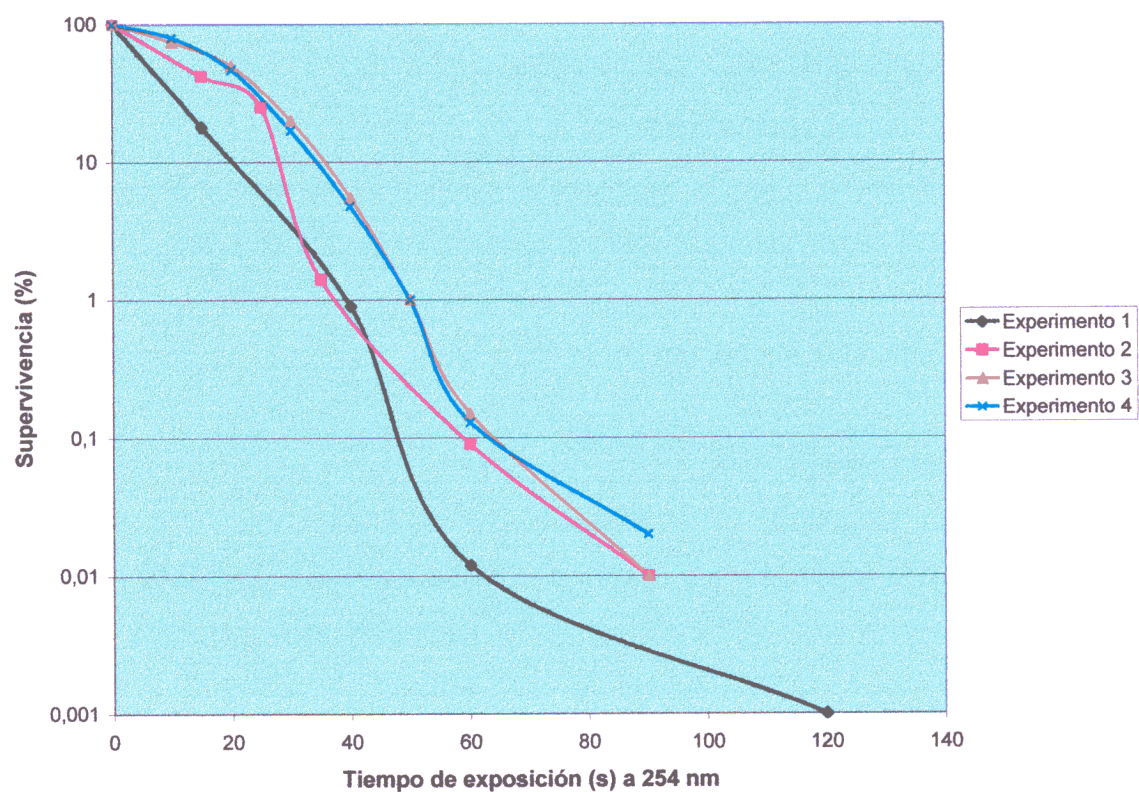


Figura 24. Curvas dosis-supervivencia con luz UV de *S. proliferans* CBS 467.74

5.1.2.2. Curvas de aparición de mutantes albinos

En la figura 25 se representa el número de mutantes albinos (por cada 10^3 supervivientes) que se obtienen al irradiar la cepa tipo (eje y2). En el primer eje de ordenadas se presenta la correspondiente curva dosis-supervivencia obtenida en el mismo experimento. Resulta interesante observar la forma sinusoidal de la curva de aparición de mutantes albinos. Con el incremento de la exposición a la luz UV, disminuye la supervivencia de las esporas y aumenta hasta un determinado límite (unos 70 s), la frecuencia de aparición de mutantes albinos, para luego decaer bruscamente.

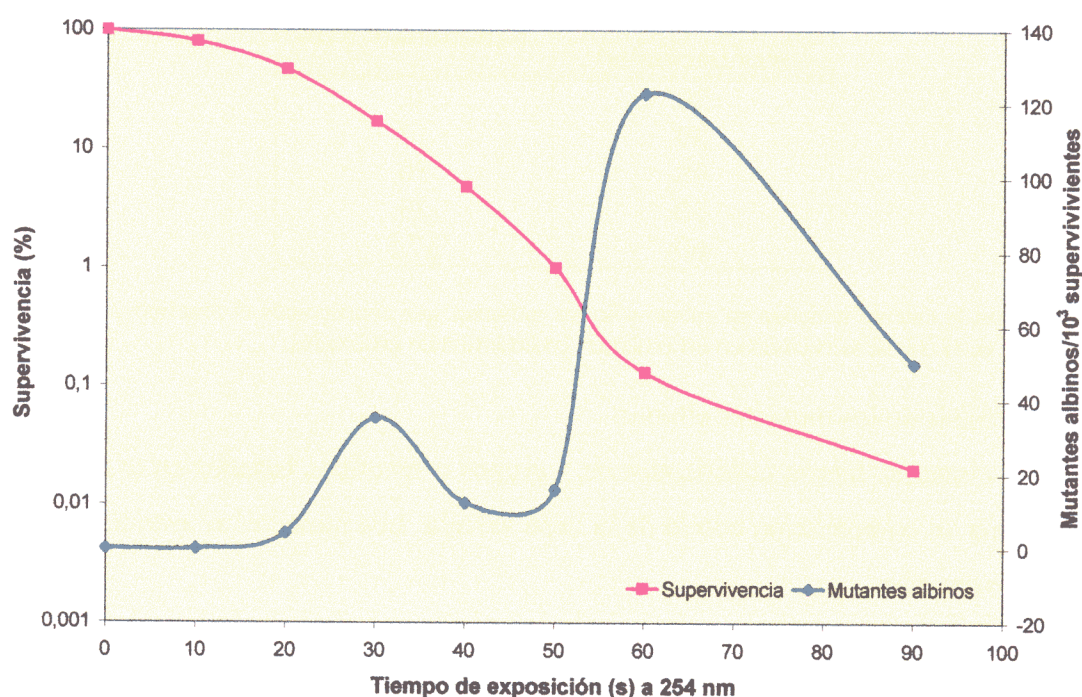


Figura 25. Curvas de aparición de mutantes albinos y de dosis supervivencia inducidos por la luz UV en *S. prolificans* CBS 467.74. Eje y1: curva de dosis-supervivencia. Eje y2: curva de mutantes albinos.

5.1.2.3. Estabilidad de los mutantes albinos

La estabilidad de los fenotipos obtenidos se estudió en dos experimentos distintos, empleando la cepa tipo de *S. prolificans*, y después de trazar la curva de aparición de mutantes albinos. Posteriormente al tratamiento mutagénico, se seleccionaron entre 10 y 30 colonias con morfología diferente a la cepa salvaje. Para ello, se hizo un subcultivo en APD, 30°C, 7-9 días, procesando siempre en paralelo la cepa salvaje. Con las colonias que conservaron la morfología distinta se hizo otro subcultivo en APD, 30°C, 7-9 días. A continuación se calcula la frecuencia de estabilidad (Tabla 14). Finalmente, entre aquellas que conservaron el fenotipo distinto, se seleccionaron los mutantes albinos.

La reversión fue al tipo salvaje en todas las variaciones. No hubo otros cambios entre los diferentes fenotipos resultantes. La estabilidad de las variaciones parece independiente del fenotipo, aunque las colonias de aspecto macroscópico levaduriforme recuperaron la morfología de la cepa salvaje con mayor frecuencia. En el resto de los casos, no se vio ninguna asociación entre el fenotipo y su estabilidad. Las colonias seleccionadas con tiempos de exposición a la luz UV menores de 30 s, siempre revirtieron al fenotipo salvaje (Tabla 14).

Tabla 14. Frecuencias de estabilidad de los mutantes albinos.

Tiempo de irradiación (s)	Estabilidad^a (%)
20	0
30	17
40	50
50	33
60	37,5

^aLa estabilidad se calculó teniendo en cuenta sólo los mutantes que conservaban el fenotipo y en el mismo experimento en el que se seleccionaron los mutantes posteriormente analizados.

5.1.2.4. Análisis de los mutantes albinos

Los mutantes fueron clasificados en 5 grupos o fenotipos basados en la morfología de la colonia en comparación con la de la cepa salvaje. Los mutantes se estudiaron en los siguientes aspectos:

1. Observación macro- y microscópica en APD.
2. Microcultivo.
3. Comparación de la velocidad de crecimiento: diámetro de una colonia crecida en APD a 30°C durante 10 días.
4. Sensibilidad a antifúngicos empleando la técnica de microdilución. Se utilizaron esporas con aquellos mutantes que esporulan y fragmentos de hifas con los que esporulan poco o no esporulan.
5. Sensibilidad a anfotericina B en APD.

Las características de cada mutante se describen en la Tabla 15 y la sensibilidad a antifúngicos está detallada en las Tablas 16 y 17. La morfología de los tres primeros fenotipos, así como la de la cepa salvaje, se muestra en la figura 26. Los mismos fenotipos se repitieron en dos experimentos diferentes y son independientes del tiempo de irradiación al que se seleccionaron.

Tabla 15. Características fenotípicas de los mutantes albinos de *S. prolificans* CBS 467.74 a 30°C.

	Cepa salvaje	Mel-1	Mel-2	Mel-3	Mel-4	Mel-5
Color anverso APD	Gris-marrón	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Color reverso APD	Negro	Blanco	Blanco-gris	Blanco	Blanco	Blanco
Ø a 10 días	51	50	50	27	17	16
Morfología	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Rugosa	Rugosa
Textura	Seca	Seca	Seca	Seca	Húmeda	Húmeda
Geometría	Sectores-concéntricos	Espiral-concéntrico	Sectores-concéntricos	Concéntrica	Sectores	Sectores
Micelio	Uniforme	Uniforme	Uniforme, poco central	Uniforme	Elevado central	Central
Microscopía	Esporas e hifas largas y negras	Pocas esporas, hifas muy largas y estrechas	Hifas anchas normales, menos esporas	Pocas hifas y esporas, no se ven células conidiógenas	Hifas muy largas y estrechas, células conidiógenas muy cortas con hifas en su extremo	Sin esporas, hifas claras, largas y estrechas

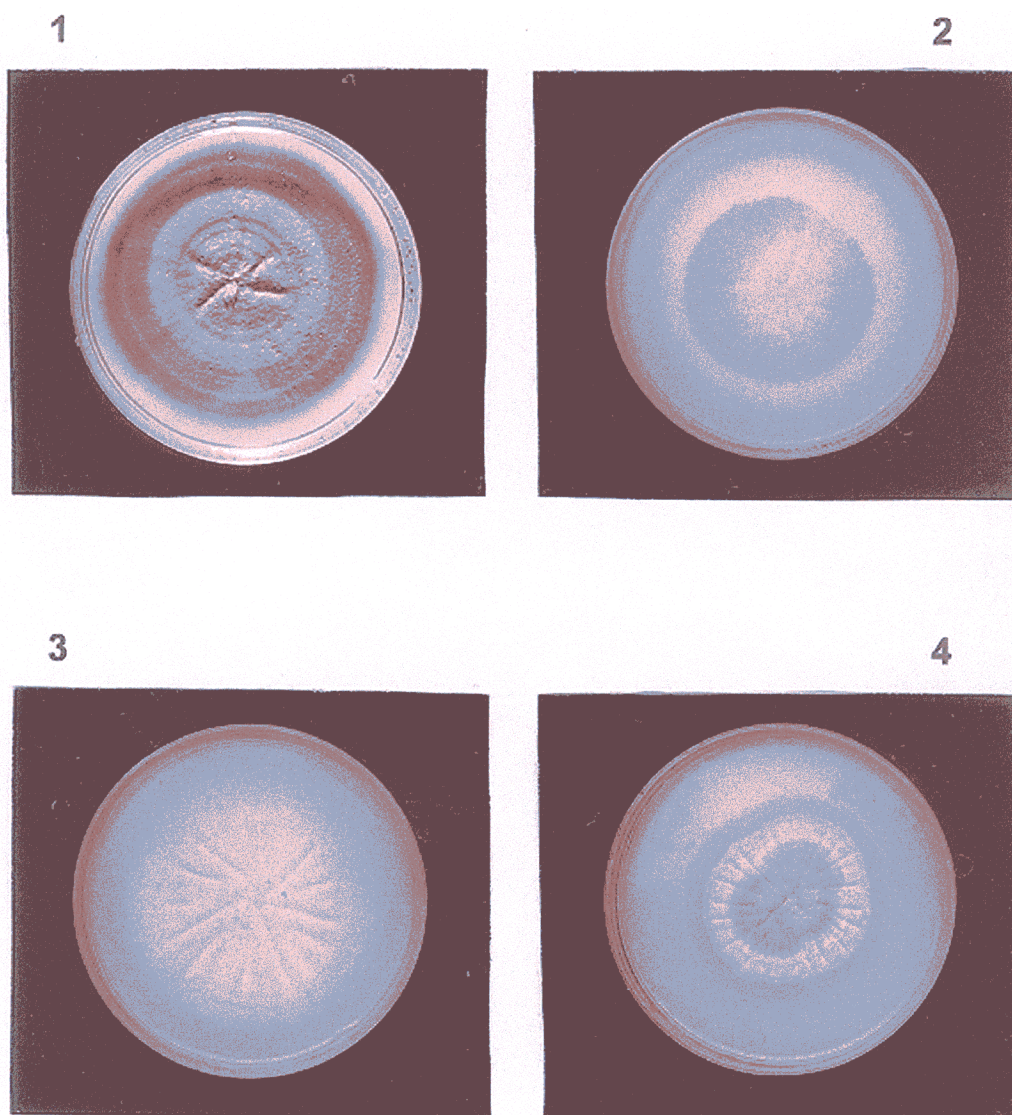


Figura 26. Morfología macroscópica de *S. prolificans* CBS 467.74 y tres de sus mutantes albinos en agar patata (APD) a 30°C. Número 1: cepa salvaje. Número 2: mutante Mel-1. Número 3: mutante Mel-2. Número 4: mutante Mel-3.

Tabla 16. CMI's obtenidas por el método de microdilución de la cepa tipo de *S. prolificans* y sus mutantes albinos.

Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$)				
	Anfotericina B	Nistatina	Fluorocitosina	Itraconazol	Ketoconazol
Salvaje	> 16	128	> 128	> 8	128
Mel-1 ^a	2	4	> 128	8	NC
Mel-2	16	64	> 128	> 8	128
Mel-3	8	64	128	> 8	64
Mel-4	NC ^b	8	128	8	8

^a Este mutante creció menos que la cepa salvaje en el control de crecimiento o bien no creció (NC).

En cuanto a la sensibilidad a anfotericina B evaluada por el método de dilución en agar, todos los mutantes crecen a la concentración máxima ensayada (128 $\mu\text{g/ml}$). El mutante albino de fenotipo mel-5 presentaba una tasa de esporulación y crecimiento tan pequeña que resultó imposible llevar a cabo con él ninguna prueba de sensibilidad.

Tabla 17. Sensibilidad a anfotericina B evaluada por el método de dilución en agar (APD) de la cepa tipo de *S. prolificans* y sus mutantes albinos.

Cepa	Diámetro (cm) de la colonia a los 10 días
	Anfotericina B (128 $\mu\text{g/ml}$)
Salvaje	20
Mel-1	32
Mel-2	21
Mel-3	20
Mel-4	No se realizó

En conjunto se puede concluir que los mutantes albinos presentan valores de resistencia a los antifúngicos similares a los de la cepa salvaje. El mutante Mel-1 es más sensible por la técnica de microdilución, sin embargo tiene un mayor diámetro de la colonia en la técnica de dilución en agar. Los mutantes Mel-4 y Mel-5 no pudieron ser evaluados totalmente ya que, probablemente, presentan mutaciones que les impiden esporular y desarrollarse como la cepa salvaje.

5.1.2.5. Mutantes resistentes a cicloheximida.

Previamente se calculó la CMI de cicloheximida de *S. prolificans* CBS 467.74 por el método de dilución en agar y a 30°C (Métodos 2.2.3). Esta cepa presenta muy poco

crecimiento a 50 $\mu\text{g/ml}$ y no crece en absoluto a 100 $\mu\text{g/ml}$. Así pues, se tomó como concentración de selección de cicloheximida esta última.

Con un procedimiento análogo al de las curvas de dosis-supervivencia (Métodos 7.2), se intentaron aislar, después de mutagenizar, colonias resistentes a cicloheximida. Se sembraron, para cada tiempo de irradiación, alícuotas y diluciones en medio APD suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida y en APD sin suplementar. También se sembraron en esta misma concentración, colonias que llevaban un ciclo de crecimiento (en APD), después de mutagenizar. Todo ello con la finalidad de encontrar mutantes resistentes a cicloheximida y realizar una curva de aparición de mutantes. Siempre se procesó en paralelo la misma cepa sin irradiar. Al no obtener resultados positivos, se calcularon las frecuencias mínimas necesarias para encontrar mutantes resistentes a cicloheximida, inducidos con luz UV. La investigación de $5 \cdot 10^7$ células después del tratamiento con luz UV no produjo ningún mutante resistente a cicloheximida.

En los mismos experimentos, como control, se hicieron cultivos en placas con cicloheximida a 50 $\mu\text{g/ml}$. Esto permitió hacer una curva de eficiencia de plaqueo inducida con luz UV (figura 27).

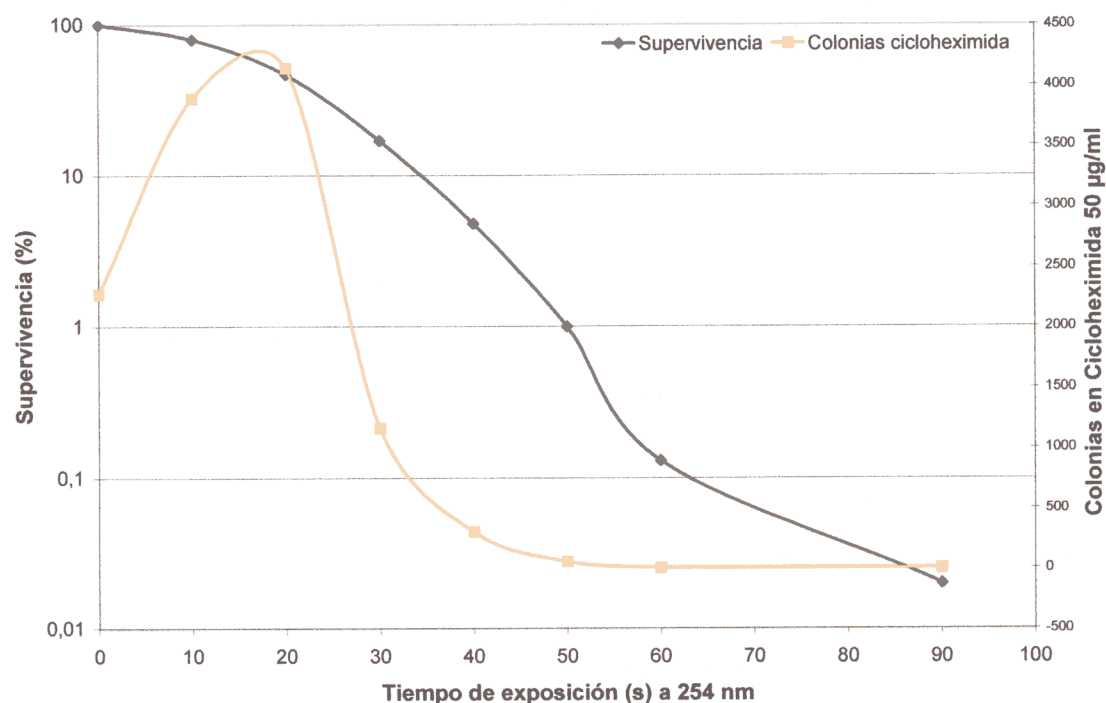


Figura 27. Curvas de eficiencia de plaqueo en cicloheximida 50 $\mu\text{g/ml}$ y de dosis-supervivencia con luz UV de *S. prolificans* CBS 467.74. Eje y1: curva de dosis-supervivencia. Eje y2: curva de eficiencia de plaqueo.

Se calculó, además, la sensibilidad a cicloheximida de los mutantes albinos con el objetivo de comprobar si la pérdida de melanina los hacía más sensibles. Todos ellos tenían una CMI estricta de 100 µg/ml mediante las técnicas de macrodilución y dilución en agar y de 50 µg/ml en el caso de la técnica de microdilución, que son idénticas a las de la cepa salvaje.

5.2. TRANSFORMACION GENETICA DE *S. prolificans*

5.2.1. Marcadores de selección

Como marcador de selección para los diferentes experimentos de transformación genética de *S. prolificans* se eligió el gen *hph* de la fosfotransferasa de higromicina B de *E. coli*. La expresión de este gen en los hongos confiere resistencia a dicho aminoglicósido. Para comprobar la utilidad de dicho gen se analizó la sensibilidad a higromicina B de la cepa tipo de *S. prolificans* mediante la técnica de dilución en agar (Métodos 2.2.3.). A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los antifúngicos, la higromicina B inhibe a *S. prolificans* a concentraciones relativamente bajas (25 µg/ml), lo que permitió el empleo del gen de resistencia *hph* como marcador de selección dominante.

5.2.2. Vectores basados en el cósmido para ascomicetos pMLF2

El cósmido pMLF2 (Materiales 1.2.) posee el gen de resistencia a higromicina B bajo el control de las secuencias del promotor y terminador de los genes *gpd* y *trpC*, respectivamente, de *Aspergillus nidulans* (An *et al.*, 1996). Este cósmido fue seleccionado para los experimentos de transformación ya que se trata de un vector específico para ascomicetos, y a *S. prolificans*, por los estudios de taxonomía molecular (Resultados 1), se le engloba dentro de esta división.

5.2.2.1. Construcción de un vector específico para *S. prolificans*

El proceso de construcción de un vector específico para *S. prolificans* partió del cósmido pMLF2. En primer lugar se digirió con la endonucleasa *HindIII*, para la que su secuencia poseía un único lugar de corte. El plásmido lineal resultante, de 9,2 kb, se desfosforiló con fosfatasa alcalina para evitar su autoligación y se purificó mediante procedimientos habituales (Sambrook *et al.*, 1989).

Por otra parte, se amplificó mediante PCR un fragmento del DNA de la cepa tipo de *S. prolificans* que contiene la región ITS1-5,8S-ITSII (figura 1, Introducción), previamente estudiada. Se diseñaron dos iniciadores basándose en las secuencias de los iniciadores ITS1 e ITS4 empleados anteriormente, pero añadiendo en su extremo 5' el sitio de restricción de la enzima *Hind*III. Los iniciadores diseñados se denominaron ITS1H e ITS4H (su secuencia se detalla en Materiales 3.3.). La reacción de PCR se llevó a cabo con las mismas condiciones y parámetros descritos para la reacción de amplificación del rDNA (Métodos 5.1.). El producto de PCR, digerido con *Hind*III (Métodos 3.2.), fue ligado al cósmido pMLF2 linearizado, y el resultado fue utilizado para transformar células de *E. coli* XL1-Blue. El plásmido resultante, que se denominó pSP1, posee las casi 9,2 kb de pMLF2 y el fragmento de 590 pb del rDNA de *S. prolificans*.

La caracterización del pSP1 se basó en las secuencias conocidas del pMLF2 y de la región ITS1-5,8S-ITSII (Resultados 1.2.). En primer lugar, se procedió a averiguar el número de copias del fragmento de rDNA. Para ello, pSP1 fue digerido con la endonucleasa *Nco*I que tiene un único punto de corte en el vector pMLF2. El resultado fue que pSP1 lleva una única copia de la región ITS1-5,8S-ITSII. Con el fin de comprobar la orientación del inserto de rDNA, pSP1 fue digerido secuencialmente con las endonucleasas *Apa*I y *Nco*I, cuyas secuencias de reconocimiento únicas estaban en el inserto y en el vector, respectivamente. La orientación del inserto es ITSII-5,8S-ITSI. En la figura 28 se representa el esquema del vector pSP1 de *S. prolificans*, con las endonucleasas de restricción utilizadas en su caracterización y en sus aplicaciones posteriores.

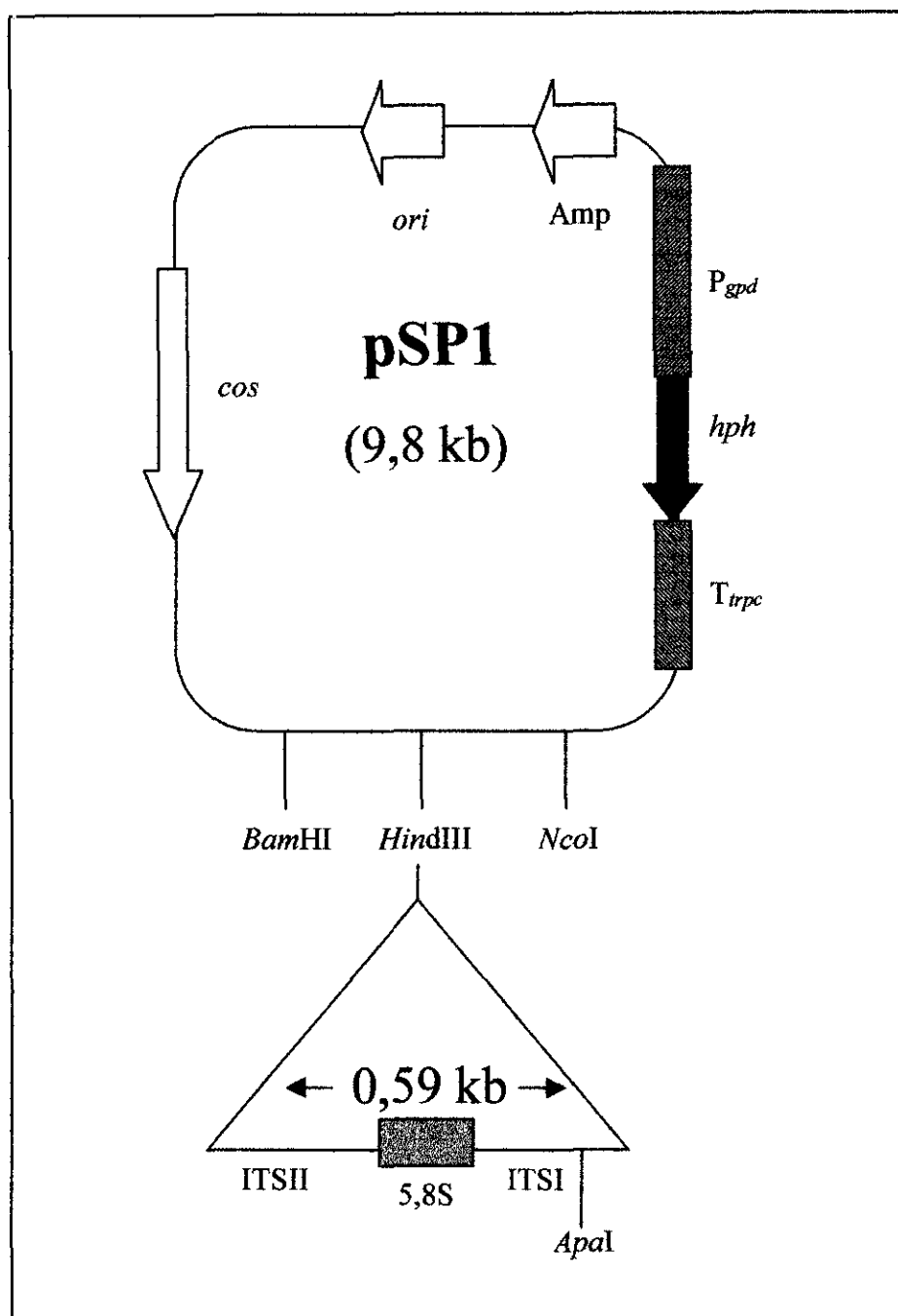


Figura 28. Representación esquemática del vector pSP1 de *S. prolificans*. Se detallan las enzimas de restricción empleadas en su construcción, caracterización y posteriores aplicaciones. El fragmento del rDNA clonado se presenta con más detalle. Los números son los tamaños moleculares, kb son kilobases. Abreviaturas: *P_{gpd}* y *T_{trpC}*, son las secuencias del promotor de *gpd* y terminador de *trpC* de *Aspergillus nidulans*; *hph* es el gen de la fosfotransferasa de higromicina B; *ori*, es el origen de replicación; *cos*, son los sitios cohesivos del fago lambda; *amp* es el gen de resistencia a ampicilina.

5.2.3. Optimización de la transformación mediante electroporación

Con el fin de optimizar las condiciones de la transformación de *S. prolificans* mediante electroporación (Métodos 8.1.) se llevaron a cabo numerosos experimentos, empleando siempre como receptora a la cepa tipo (CBS 467.74) y al plásmido pMLF2, linearizado con *Bam*HI, como vector de transformación. A continuación se enumeran las variaciones probadas; en cada caso se mantuvieron constantes el resto de las condiciones, y siempre se realizó un experimento control como comparación.

1. Enzimas líticas añadidas al medio de cultivo

La pared celular dificulta el transporte de DNA. Por ello, en el método de Chakraborty *et al.* (1991), siempre se añade, en las horas finales de incubación de las esporas germinadas, pequeñas cantidades de las enzimas líticas β -glucuronidasa y quitinasa (Métodos 8.1.). Se realizaron dos cultivos en los que se observó microscópicamente el efecto de estas enzimas por separado sobre la germinación de las esporas de *S. prolificans*. La enzima β -glucuronidasa parecía afectar levemente a los tubos germinales, mientras que no se observó ningún efecto aparente de la enzima quitinasa. En vista de estos resultados se intentó, en tres ocasiones separadas, realizar la electroporación con el cultivo tratado sólo con β -glucuronidasa, en ausencia de quitinasa. El efecto fue una reducción drástica del número de transformantes: de una media habitual de 8,2 transformantes por μ g de DNA se pasó a obtener una de 1,3 transformantes por μ g de DNA. Paralelamente, la viabilidad de las células transformadas aumentó del 60-65% al 75-100%. Luego, el efecto de la quitinasa es real y se añadió siempre al medio de cultivo con las concentraciones de referencia. Con cantidades mayores de las citadas enzimas no se conseguía su disolución en el medio de cultivo, por lo que no se pudo evaluar su efecto.

2. Empleo de cultivo congelado

Una vez estandarizada la preparación del cultivo de células a electroporar, se intentó congelar alícuotas del mismo a -70°C . El empleo de estas alícuotas facilitaría enormemente el proceso y permitiría adelantar un día la realización de los experimentos (Sánchez y Aguirre, 1996). Con este fin se electroporó *S. prolificans* empleando una alícuota de células recién descongeladas. El resultado fue una ausencia de transformantes, acompañada de una disminución de la viabilidad (del 60-65% se pasó al 2%). Por lo tanto,

en estas condiciones no se puede emplear el cultivo congelado para transformar a *S. prolificans*.

3. Densidad de esporas a electroporar

En este caso se comparó el número de esporas (o tubos germinales) que se añaden a la cubeta para electroporar (Ozeki *et al.*, 1994). El rendimiento máximo (13-15 transformantes por μg de DNA) se obtuvo cuando se pusieron en la cubeta $5\text{-}6 \cdot 10^7$ esporas/ml. Este rendimiento decae (4 transformantes/ μg de DNA) cuando se aumenta hasta $8 \cdot 10^7$ esporas/ml. En la figura 29 se muestra una gráfica con las diferentes concentraciones de esporas en la cubeta y el número de transformantes por μg de DNA obtenidos, en todos los experimentos. La gráfica es sinusoidal y aparece otro máximo para las concentraciones bajas de esporas. Con $3 \cdot 10^7$ esporas/ml aparecen sólo 3 transformantes por μg de DNA. En general, se puede decir que es mayor el rendimiento con cultivos más densos, pero dentro de un margen estrecho ($4,5\text{-}7,5 \cdot 10^7$ esporas/ml).

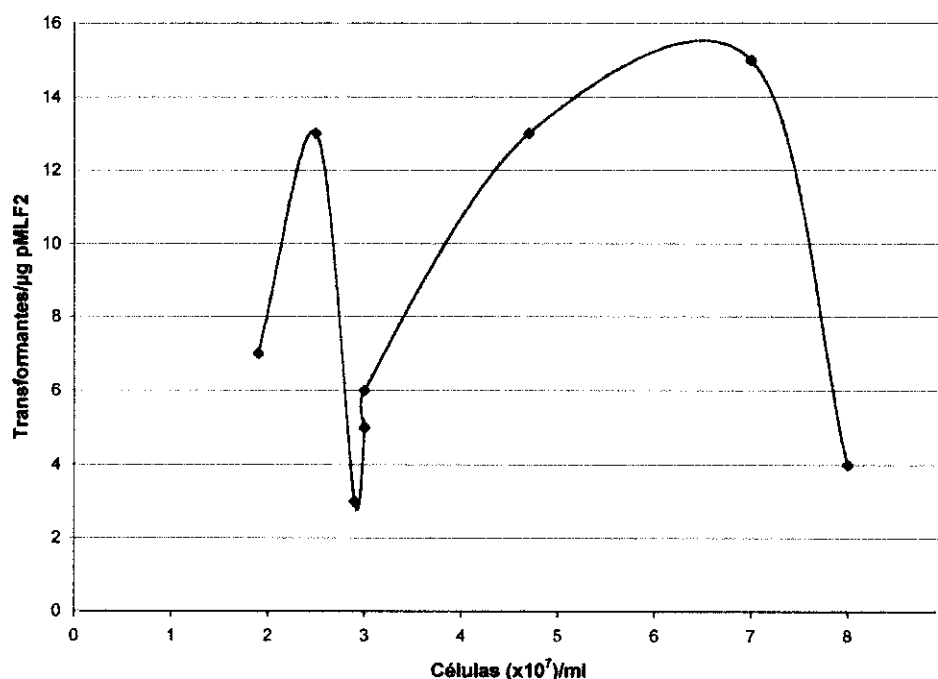


Figura 29. Efecto de la concentración de células en la transformación de *S. prolificans* con pMLF2

4. Inhibidores de nucleasas

La presencia de inhibidores de nucleasas en la cubeta impide que se produzca la degradación del DNA antes de la transformación (Manczinger *et al.*, 1997). Con este objetivo se añadió a la cubeta antes de electroporar espermina a concentración 0,01M

(Manczinger *et al.*, 1997). En estas condiciones no se pudo realizar la electroporación, ya que se produjo un salto de corriente. Este experimento se repitió dos veces para asegurarse del resultado.

5. Voltaje

La optimización del voltaje es uno de los pasos más importantes en el desarrollo de un sistema de transformación por electroporación (Chakraborty *et al.*, 1991). El protocolo seguido exigía un voltaje tan elevado (2,5 kv) que la adición a la cubeta de cualquier inhibidor como la espermina alteraba la composición del tampón e impedía la realización de la electroporación. Por este mismo motivo, el DNA se tenía que añadir en agua destilada. Se ha intentado en dos ocasiones modificar el voltaje, efectuando el experimento a 1,25 kv. Una primera vez aparecieron muchas colonias pequeñas, que al analizarlas resultaron no ser transformantes. La viabilidad fue en esta ocasión demasiado alta, del 90-100%. En un segundo experimento tampoco se obtuvieron transformantes a pesar de que la viabilidad fue más aceptable (86%).

6. Resistencia del pulso

La modificación de la resistencia del pulso se traduce en una variación de la duración de este. Con el objetivo de aumentarlo, se realizó la electroporación con una resistencia de 400 Ω en lugar de los 200 Ω habituales. La viabilidad de las esporas electroporadas disminuyó hasta un 40%, y la duración del pulso aumentó a 6,4 ms; sin embargo, no se obtuvo ningún transformante.

7. Temperatura de crecimiento

La influencia de la temperatura de crecimiento de las células electroporadas fue otro de los factores que se analizaron. El cultivo electroporado se dividió en dos alícuotas y cada una fue cultivada a 30 y a 37°C. Las colonias crecían algo más rápido a 30°C pero el número de transformantes no variaba. Probablemente una temperatura más suave favorece la regeneración del cultivo electroporado.

8. Sobreexpresión

La incubación de las células transformadas en el medio de regeneración sin el antibiótico de selección, durante un tiempo determinado, es un factor muy importante a optimizar. Se comenzó suprimiendo la sobreexpresión, es decir, cultivando las células

directamente en placas con higromicina B, pero no se obtuvo ningún transformante. A continuación se realizaron sobreexpresiones de 3-3,5 h a 30°C, que condujeron a la obtención de un solo transformante por μg de DNA. Los experimentos habituales se realizaron con 18-20 h de sobreexpresión a 30°C que dieron lugar a los mejores resultados (Tabla 18). También se intentó el aumento de la sobreexpresión a 36 h, pero apareció un fondo de células no transformadas que impidió el análisis de los resultados.

9. Concentración de higromicina B y volumen de la sobrecapa de medio de selección

Se trata de valores relativos que ayudan a obtener más rápidamente los resultados. *S. proliferans* es inhibido por completo a una concentración de higromicina B de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Resultados 5.2.). Se seleccionaron transformantes a las concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Con 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no se encontraron diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento de las colonias. Pero a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ las colonias crecían mucho más lentamente y resultaba más difícil recuperarlas a través de la sobrecapa. El control sin DNA se introducía en cada ensayo y siempre fue negativo. En los ensayos habituales se usaron como concentraciones de selección 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina B. Los volúmenes de la sobrecapa de medio de selección ensayados fueron de 5 y 10 ml y en este aspecto no se encontró ninguna variación entre el empleo de uno u otro.

El procedimiento final optimizado para llevar a cabo todos los experimentos de transformación de *S. proliferans* mediante electroporación, es el recogido en el apartado 8.1. de Métodos.

5.2.4. Transformación con diferentes vectores

El plásmido pMLF2 fue escogido para la puesta a punto de la electroporación de la cepa tipo de *S. proliferans*. Pero, como se recoge en la Tabla 18, la eficacia del sistema era bastante baja, a pesar de todos los intentos de mejorarla.

El nuevo vector pSP1, específico para *S. proliferans*, podría aumentar la frecuencia de transformación. La electroporación se llevó a cabo con pSP1 linearizado en dos sitios diferentes. El DNA de pSP1 contiene un sitio único para la endonucleasa *ApaI* que se encuentra dentro del segmento del rDNA. El DNA de pSP1 fue digerido con *ApaI*, purificado y empleado para la transformación. El uso de moléculas de pSP1 linearizadas

con *Apal* aumentó notablemente la frecuencia de transformación (Tabla 18). También se llevó a cabo la transformación con pSP1 linearizado con *Bam*HI, la misma enzima que se utilizó con pMLF2. En este caso las frecuencias de transformación fueron más bajas, no obstante siguieron siendo mayores que las obtenidas con pMLF2 (Tabla 18). La transformación de *S. prolificans* con DNA del vector pSP1 linearizado dentro del segmento procedente del rDNA produjo más transformantes que cuando se linearizó dentro del segmento de pMLF2.

Tabla 18. Frecuencia de transformación de *S. prolificans* CBS 467.74 con moléculas lineales de los plásmidos pMLF2 y pSP1.

Plásmido	Linearización	Nº ensayos	Transformantes/ μ g DNA ^a	Intervalo
pMLF2	<i>Bam</i> HI	10	8,2 \pm 4,5	(3-15)
pSP1	<i>Bam</i> HI	4	10,6 \pm 5,0	(6-16)
	<i>Apal</i>	5	15 \pm 6,3	(9-24)

^a Cada valor es la media aritmética con su desviación estándar.

5.2.5. Análisis de transformantes

5.2.5.1. Sensibilidad a higromicina B

El primer paso en el análisis de los transformantes consistió en el cálculo de su CMI de higromicina B. Los transformantes putativos fueron seleccionados en placas de APD con una concentración de higromicina B de 25-50 μ g/ml. Para calcular su CMI se escogió el método de microdilución que permitía analizar hasta ocho colonias de una vez (Métodos 2.2.1.). Se incluyó en cada ensayo la cepa receptora, cuya CMI de higromicina B por el método de microdilución es 50 μ g/ml. Se escogieron transformantes procedentes tanto de experimentos en los que se electroporó con pMLF2, como de aquellos en los que se hizo con pSP1. Todos ellos eran resistentes a concentraciones de más de 100 μ g/ml. La CMI de higromicina B de la mayoría de los transformantes estaba entre 800 y 1600 μ g/ml (Tabla 19).

5.2.5.2. Estabilidad de los transformantes

1. PCR del gen *hph*

Una prueba rápida de identificación de los transformantes consistió en el diseño de una PCR (Métodos 8.2.) con dos iniciadores dirigidos a secuencias del gen *hph* (Rohe *et al.*, 1996). Igualmente, fueron escogidos transformantes procedentes tanto de experimentos en los que se electroporó con pMLF2, como de aquellos en los que se hizo con pSP1. Se realizaron cultivos monoespora de los transformantes sin el antibiótico de selección con el objetivo de extraer el DNA genómico (Métodos 4.1.). Todos los transformantes resistentes a higromicina B originaron productos de amplificación del tamaño esperado (960 pb) (Tabla 19). En contraste, cuando se empleó el DNA de la cepa salvaje como molde no se produjo ningún fragmento (figura 30). El DNA del cósmido pMLF2 se empleó como control positivo. El resultado positivo de esta prueba indica que el DNA plasmídico está presente en el DNA genómico de los transformantes de *S. prolificans*.

2. Estabilidad mitótica

Para el análisis de la estabilidad mitótica se escogieron transformantes procedentes de experimentos realizados el mismo día y a los que ya se les habían realizado las dos pruebas descritas anteriormente. En total se estudiaron 13 transformantes, de los cuales 3 provenían de una electroporación con pMLF2 y 10 con pSP1. De este último grupo, 4 transformantes fueron originados con moléculas de pSP1 linearizado con *Bam*HI y 6 con *Apa*I (Tabla 19). Dichos transformantes fueron subcultivados tres veces en el medio de selección (higromicina B a 25 µg/ml). A partir de este tercer subcultivo se realizaron dos cultivos con cada uno: uno en medio APD y otro en APD con higromicina B a 25 µg/ml. A estos dos cultivos, que fueron tratados independientemente, se les realizó la prueba de sensibilidad a higromicina B por el método de microdilución (Métodos 2.2.1.). Todos ellos mantuvieron el mismo fenotipo de resistencia a higromicina B. La variación en una dilución de la CMI de higromicina B no se consideró como significativa. Se concluye que los transformantes son estables, incluso en ausencia de presión de selección.

5.2.5.3. Análisis genético de los transformantes

Los transformantes de *S. prolificans* obtenidos por electroporación fueron analizados por hibridación mediante el método de “Southern” (Métodos 8.2.2.). El análisis genético fue realizado con los mismos 13 transformantes seleccionados para examinar la estabilidad mitótica. Como sonda se empleó el fragmento de 960 pb del gen *hph* del plásmido pMLF2, amplificado por PCR. En cada hibridación se incluyó el DNA de la cepa salvaje como control negativo y el del plásmido pMLF2 linearizado como control positivo. El plásmido pMLF2 origina una señal positiva de tamaño cercano a 9,4 kb.

En primer lugar se realizaron hibridaciones con el DNA de los transformantes digerido con la enzima *NotI*. Esta enzima tiene un solo sitio de reconocimiento en los dos vectores pMLF2 y pSP1 y se caracteriza por su baja frecuencia de digestión del DNA. El resultado fue un único fragmento de hibridación en todos los transformantes. Este fragmento era igual en todos ellos y además su tamaño coincidía con el del DNA total. No apareció ningún fragmento del tamaño del plásmido, lo que confirma la integración del DNA plasmídico en los cromosomas de los transformantes.

El DNA de los transformantes fue digerido con la enzima *BamHI*. Esta enzima corta a los plásmidos pMLF2 y pSP1 en un sitio único que, además, no se encuentra en la secuencia del gen *hph* elegida como sonda (figura 28). Los resultados obtenidos fueron heterogéneos. En la Tabla 19 se recogen las características de los transformantes analizados. Todos los transformantes originaron un único fragmento de hibridación (figura 31), lo cual es signo de que se han producido procesos sencillos de integración en un solo lugar del DNA de la cepa receptora.

Los transformantes pM1E, pS3E, pS9E y pS7E son iguales y la banda de hibridación obtenida es de tamaño muy próximo a la del plásmido lineal (aproximadamente de 9,4 kb). Este dato, junto a que proceden de la integración en el DNA cromosómico, sugiere la presencia de duplicaciones en tandem del DNA transformante. Además, su intensidad relativa es mayor que la del resto de los transformantes. Esta señal en pS7E y pS9E, que proceden de la transformación con pSP1-*Apal*, sólo puede explicarse por la integración en tandem. Los transformantes con señales de tamaño mayor al pMLF2, es decir, pM2E, pM3E, pS6E, pS8E, pS10E, pS11E y pS12E, han perdido un sitio *BamHI* en la integración y pueden portar una o más copias del DNA plasmídico. Algunos de estos transformantes son iguales entre sí: pM2E, pS8E y pS10E; pM3E y pS12E; pS6E y pS11E. Resulta interesante la existencia de dos transformantes, pS4E y pS5E, cuyo

fragmento de hibridación es de menor tamaño que el de pMLF2. Ambos proceden de la transformación con pSP1 linearizado con *Bam*HI y en este caso se puede sugerir la existencia de reordenaciones con pérdidas de parte del DNA del plásmido. En conjunto se obtienen 5 tipos entre los 13 transformantes analizados y en la figura 31 se muestran 4 de los 5 patrones. Los tres transformantes procedentes de la electroporación con pMLF2 tienen tres tipos distintos. Los 10 originados de la transformación con pSP1 se agrupan en 5 tipos.

Tabla 19. Características de los transformantes de *S. proliferans*

Nombre	Origen	PCR	CMI higromicina B (μ g/ml)		Estabilidad mitótica	Hibridación <i>hph</i>	
			- Hig ^a	+ Hig ^b		Fragmento (kb)	Tipo
pM1E	PMLF2- <i>Bam</i> HI	+	>1600	800	+	\approx 9,4	1
pM2E	PMLF2- <i>Bam</i> HI	+	1600	800	+	23-9,4	2
pM3E	PMLF2- <i>Bam</i> HI	+	1600	800	+	\approx 23	3
pS3E	PSP1- <i>Bam</i> HI	+	>1600	>1600	+	\approx 9,4	1
pS4E	PSP1- <i>Bam</i> HI	+	1600	1600	+	4,3-6,5	4
pS5E	PSP1- <i>Bam</i> HI	+	800	800	+	4,3-6,5	4
pS6E	PSP1- <i>Bam</i> HI	+	800	800	+	>23	5
pS7E	PSP1- <i>Apa</i> I	+	800	1600	+	\approx 9,4	1
pS8E	PSP1- <i>Apa</i> I	+	800	800	+	23-9,4	2
pS9E	PSP1- <i>Apa</i> I	+	800	800	+	\approx 9,4	1
pS10E	PSP1- <i>Apa</i> I	+	1600	1600	+	23-9,4	2
pS11E	PSP1- <i>Apa</i> I	+	1600	1600	+	> 23	5
pS12E	PSP1- <i>Apa</i> I	+	>1600	>1600	+	\approx 23	3

^a - Hig, los transformantes se incubaron en APD.

^b + Hig, los transformantes se incubaron en APD suplementado con higromicina B a 25 μ g/ml.

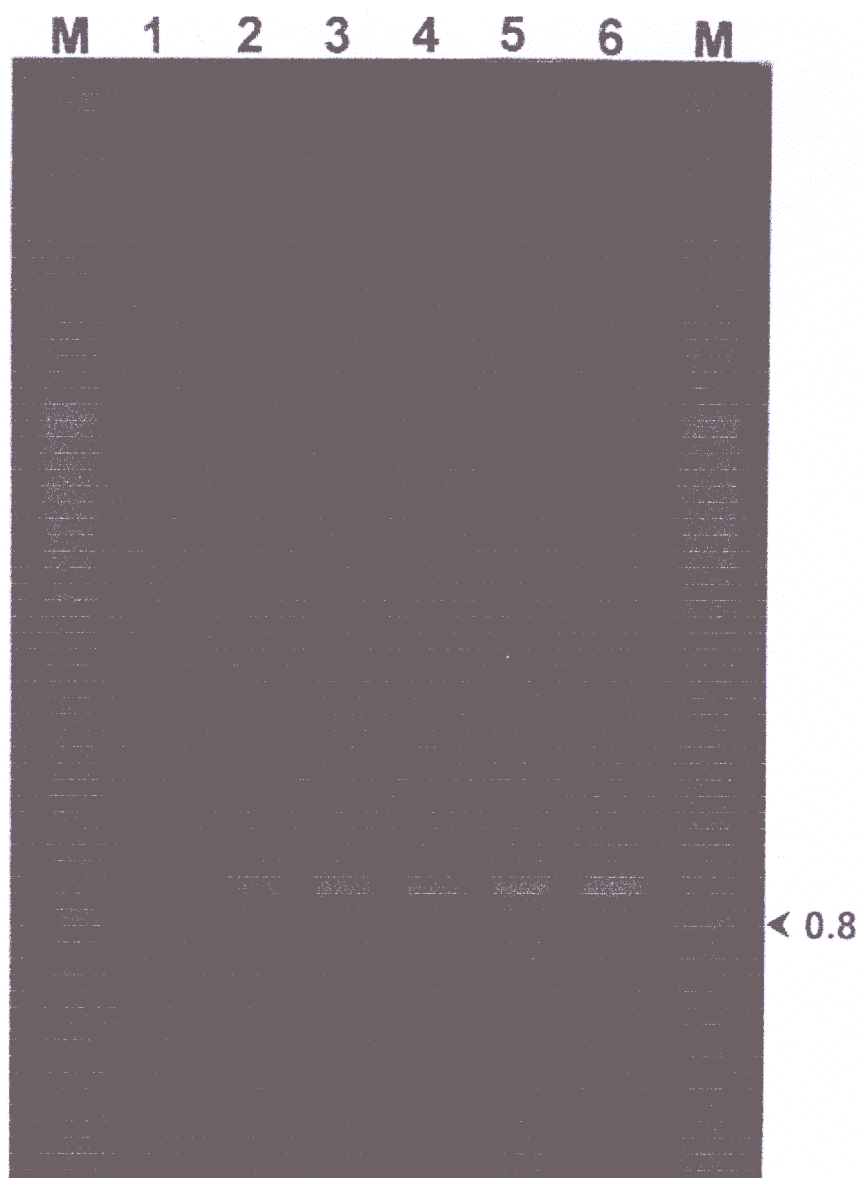


Figura 30. Resultado de la PCR para la detección del gen *hph*. Pocillos M, marcador de 100 pb. Pocillo 1, *S. prolificans* CBS 467.74. Pocillos 2 y 3, ejemplos de *S. prolificans* CBS 467.74 transformado con pMLF2. Pocillos 4 y 5, ejemplos de *S. prolificans* CBS 467.74 transformado con pSP1. Pocillo 6, control positivo. Los tamaños moleculares están indicados en kilobases.

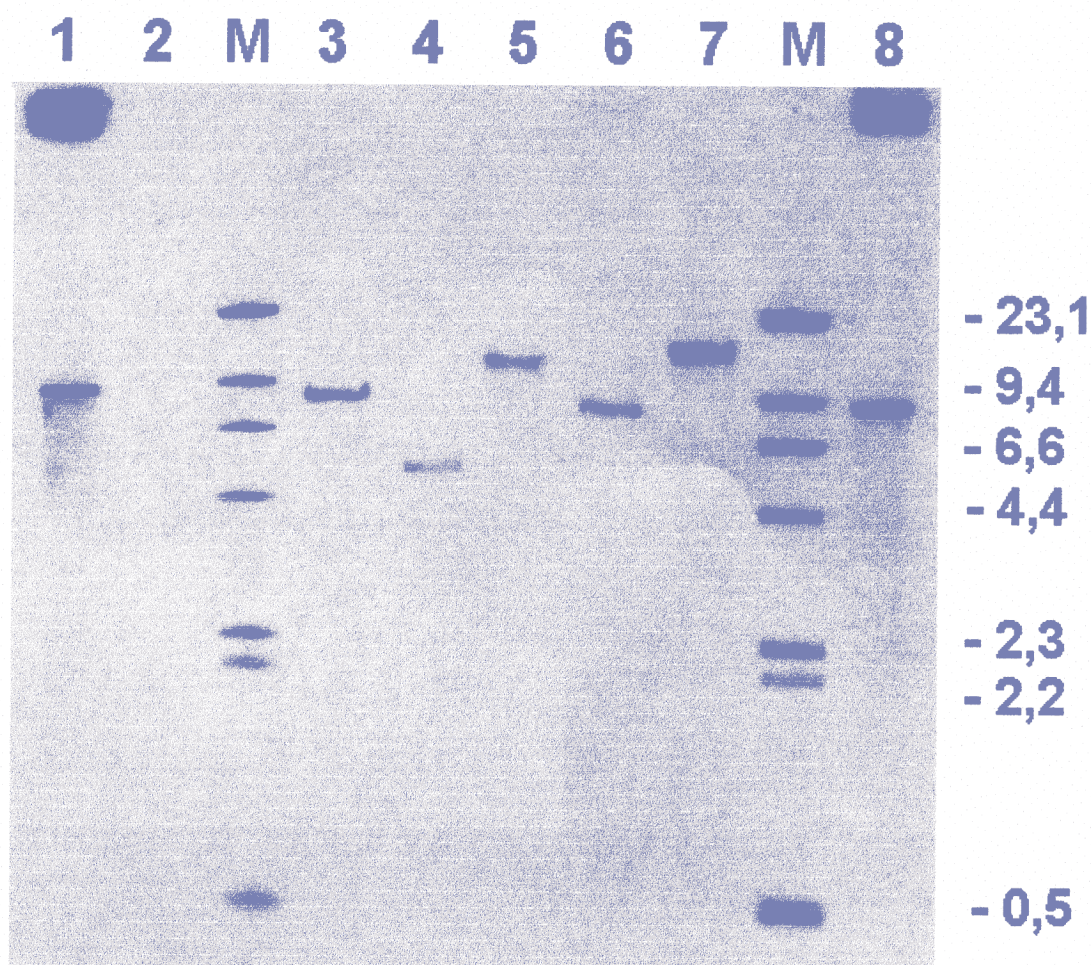


Figura 31. Hibridación del DNA genómico de transformantes de *S. proliferans* con la sonda *hph*. Pocillos 1 y 8, control positivo (pMLF2). Pocillo 2, control negativo (cepa receptora de *S. proliferans*). Pocillo 3, transformante pS3E. Pocillo 4, transformante pS5E. Pocillo 5, transformante pS8E. Pocillo 6, transformante pM1E. Pocillo 7, transformante pS12E. Pocillos M, marcador (fago lambda *Hind*III marcado con fluoresceína). Los tamaños moleculares están indicados en kilobases.

DISCUSSION

1. TAXONOMIA MOLECULAR DE *S. prolificans*

La clasificación de los hongos recae en un número relativamente pequeño de características morfológicas y fisiológicas. La taxonomía clásica se ha empleado con éxito para un gran número de hongos, pero no ha producido datos reales para la identificación de muchos otros. Además, la clasificación se complica con los hongos deuteromicetos, sin estado sexual conocido, que son artificialmente englobados con otros de los que si se tiene noticia de una fase sexual o teleomorfo. Esta es la situación que acontece con *S. prolificans*.

La aplicación de técnicas moleculares ha revolucionado la disciplina de la sistemática fúngica y ha proporcionado las herramientas para la discriminación de hongos muy relacionados (a casi cualquier nivel de resolución requerida), y también para la detección de especies fúngicas, en algunos casos incluso superando a los métodos tradicionales (Bruns *et al.*, 1991).

En hongos filamentosos, los estudios de las secuencias de nucleótidos de los dos ITS del rDNA han revelado que su composición es mucho más variable que la de las subunidades 18S ó 28S (Mugnier, 1998). Por lo tanto, se ha escogido una región más amplia para establecer las relaciones entre *S. prolificans* y *S. apiospermum*: ITS1-5,8S-ITSII. Con este complejo se lograban reunir zonas más variables y evolucionadas (ITS1 e ITSII), con una región descrita como más conservada (el rDNA 5,8S). De esta manera, se han alcanzado los requisitos necesarios para emplear una región del DNA en investigaciones de sistemática molecular: evoluciona en una proporción adecuada, se comporta como si fuera una región unicopia y tiene la misma función “desconocida” en todos los hongos a estudiar. Actualmente, el análisis del complejo ITS1-5,8S-ITSII se ha convertido en una norma para estudios de taxonomía y filogenia de todo tipo de hongos (Taylor *et al.*, 1999).

1.1. ANALISIS DEL COMPLEJO ITS1-5,8S-ITSII DE *Scedosporium* sp.

El principal objetivo del estudio taxonómico fue evaluar los patrones de restricción y el porcentaje de divergencia en la secuencia del complejo ITS1-5,8S-ITSII de las dos especies del género imperfecto *Scedosporium*. Todo ello con el último propósito de determinar la utilidad de esta región del DNA como marcador en estudios filogenéticos y de sistemática molecular de *Scedosporium* sp. Los iniciadores empleados para la reacción

de PCR (White *et al.*, 1990), amplificaron con éxito el rDNA de ambas especies. Los patrones de restricción de los amplificados son específicos de cada especie, como estaba descrito (Lennon *et al.*, 1994). No se encontró ninguna variación entre las cepas clínicas y ambientales de *S. prolificans*. Luego no se puede concluir que esta región diferencie las cepas que proceden de dos nichos ecológicos distintos (el medio ambiente y el cuerpo humano).

Como se esperaba, el análisis de la secuencia de nucleótidos de los amplificados mostró que esta región está altamente conservada en *S. prolificans*. Los resultados muestran que la variación de secuencia en el género *Scedosporium* es suficiente para realizar un análisis más profundo de sus dos especies (Ruiz-Díez y Martínez-Suárez, 1999). En la figura 4 de Resultados 1.2. se puede observar su alineación con la máxima homología. El tamaño total del complejo es mayor en *S. apiospermum* (527 pb) que en *S. prolificans* (495 pb). La divergencia total de este complejo (sin considerar las secuencias conservadas de los iniciadores) es del 11,6%.

La diferencia encontrada en este complejo ha permitido el diseño de iniciadores que identifican ambas especies, mediante una única reacción de PCR (Wedde *et al.*, 1998). En el trabajo de Wedde y colaboradores, se ha diseñado un iniciador específico para cada especie de *Scedosporium*. Estos iniciadores están basados en la secuencia del espaciador ITSII. Su sistema de identificación por PCR consiste en una reacción, con un iniciador específico y otro general (de la subunidad 28S), que produce o no amplificado en función de la especie de *Scedosporium* de que se trate. Aunque el sistema resulta específico con *S. prolificans*, no lo es con *S. apiospermum*, ya que la reacción de PCR también amplifica el DNA de otras especies fúngicas (en este caso de *Pseudallescheria* sp.). Quizás si se diseñaran dos iniciadores totalmente específicos, basándose en la secuencia de la región completa, se conseguiría eliminar estos falsos positivos en la reacción de PCR.

1.2. EVOLUCION EN EL COMPLEJO ITS1-5,8S-ITSII DE *Scedosporium* sp.

La zona más variable es el ITSII, que presenta variaciones tanto en la secuencia de nucleótidos como en su extensión total (183 pb en *S. prolificans* y 200 pb en *S. apiospermum*, figuras 3 y 4 de Resultados 1). Quizás esta mayor variabilidad del ITSII se deba a su falta concreta de función, que hace que esté menos conservado. El otro espaciador, ITS1, también muestra cambios entre ambas especies y su longitud es de 156 pb en *S. prolificans* y 169 pb en *S. apiospermum*. Sin embargo, la región más próxima al

gen 18S está más conservada en ambas especies (figura 4 de Resultados 1.2.). Esta observación apunta a que sus nucleótidos pueden servir como ayuda en el procesamiento del RNA de dicha subunidad ribosomal 18S. Este hecho ya había sido descrito en levaduras (Torres *et al.*, 1990) y en algunos estudios de hongos filamentosos (Chambers *et al.*, 1986; O'Donnell, 1992).

En conjunto, las diferencias entre las secuencias de los dos ITS de *Scedosporium* son mutaciones puntuales y sucesos de inserción/delección que no están distribuidos uniformemente a lo largo de los espaciadores (Tabla 7 de Resultados 1.2.). Se han encontrado en la misma proporción transiciones (cambios de A por G ó C por T) y transversiones de nucleótidos púricos por pirimidínicos (A/G por C/T). En cuanto a las inserciones y/o delecciones son, en general, de 1-4 nucleótidos. El porcentaje de G+C de los ITS I e ITS II en *S. prolificans* y *S. apiospermum* es muy similar y cercano al 50%. Este dato indica una coevolución molecular de ambos espaciadores. La coevolución de los espaciadores transcritos existe en muchos otros organismos, aunque no se presenta en todos aquellos en los que esta región se ha estudiado (Torres *et al.*, 1990). La presencia de estas regiones divergentes rodeando a otra convergente (5,8S) indica fuertes presiones de selección y, por lo tanto, una evolución rápida de los espaciadores transcritos.

La región del gen 5,8S es la más conservada. Sólo existen dos pequeñas diferencias entre ambas especies de *Scedosporium*, que consisten en la inserción de dos nucleótidos (C y G) en la secuencia de *S. apiospermum* (Tabla 7 de Resultados 1.2.). También existe una gran homología con la secuencia de *N. crassa* (figura 4 de Resultados 1.2.). Esta conservación de secuencia es totalmente previsible (Bruns *et al.*, 1991) y puede deberse a que el rRNA 5,8S interacciona con el rRNA 28S a través de puentes de hidrógeno. Estos puentes de hidrógeno hacen que, durante la evolución, se produzcan cambios compensatorios de bases para mantener esta interacción (Chambers *et al.*, 1986).

1.3. ANALISIS FILOGENETICO

En el árbol filogenético (figura 5 de Resultados 1.2.) *S. prolificans* se agrupa con el teleomorfo de *S. apiospermum*, es decir con *P. boydii*, formando una única rama. Luego se confirma que *S. prolificans* es miembro de la familia *Microascaceae* y orden *Microascales*. Dentro de los hongos ascomicetos filamentosos analizados, se encuentran más próximos a *Acremonium uncinatum* y *Trichoderma harzianum*. Ambos hongos son de otro orden, sin embargo pertenecen también a la clase de los *Pirenomicetes*. Los hongos

citados constituyen en el árbol una unidad de evolución, formando un grupo monofilético. Los ascomicetos más lejanos a *Scedosporium* en el árbol filogenético, corresponden al género *Aspergillus*, con una divergencia de alrededor del 27%. El género *Aspergillus* se engloba dentro de otra clase, la de los *Plectomicetes*. En definitiva, el árbol presenta una clasificación de *Scedosporium* sp. que coincide con la determinada por los métodos más clásicos (Malloch y Salkin, 1984; Sutton *et al.*, 1998).

En otros trabajos en los que se dibujó un árbol filogenético, se encuentran algunos errores en la selección de la región estudiada: Wedde *et al.* (1998) utilizan sólo el segundo espaciador transcrito ITSII, lo que les lleva a encontrar una gran distancia evolutiva entre las dos especies de *Scedosporium*. Como se ha demostrado en diversos trabajos (Berbee *et al.*, 1995; De Hoog *et al.*, 1998; Mugnier, 1998;) este espaciador es demasiado variable como para efectuar un análisis filogenético real y definitivo. Además, estos autores sólo incluyen especies muy relacionadas (*Scedosporium* sp., *Pseudallescheria* sp. y *Petriella* sp.). En conclusión, el modelo de árbol presentado por estos investigadores, produce una imagen filogenética muy limitada de *Scedosporium* sp.

El árbol filogenético global realizado con el complejo ITS1-5,8S-ITSII constituye un fiel reflejo del esquema evolutivo seguido por este tipo de ascomicetos. Con él se obtiene una idea más general de la distancia genética entre hongos filamentosos muy importantes, tanto desde el punto de vista médico como económico. El presente estudio (Ruiz-Diez y Martínez-Suárez, 1999) resulta complementario del realizado por Issakainen *et al.* (1997). Estos autores, mediante el estudio del rDNA 18S, clasifican diversos teleomorfos y anamorfos de los géneros próximos a *Scedosporium*. Los resultados de uno y otro trabajo no son excluyentes sino que se complementan, y conducen a una visión bastante completa de la posición y relaciones del hongo imperfecto *S. prolificans*.

Este análisis basado en la región ITS1-5,8S-ITSII permitirá en el futuro una clasificación filogenética más certera de los deuteromicetos y de otros hongos. El empleo de la información de esta región pequeña (alrededor de 600 pb) del rDNA, constituirá un gran beneficio no sólo para el estudio filogenético sino también para la identificación de especies.

2. LA RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS DE *S. prolificans*

Para examinar la sensibilidad a antifúngicos de *S. prolificans* se han estudiado las actividades de los ocho antifúngicos más empleados en la terapia de las infecciones fúngicas humanas. Además, se incluyeron como comparación, aparte de la cepa control *Paecilomyces variotii* ATCC 22318, dos cepas de *S. apiospermum*. *S. prolificans* es resistente a todos los antifúngicos, mientras que *S. apiospermum* presenta sensibilidad variable (Resultados 2.1.1.).

Para realizar estudios más específicos, se eligió a la anfotericina B como antifúngico clave. Este antifúngico poliénico se caracteriza por ser la última elección en el tratamiento de las infecciones fúngicas diseminadas y, además, la mayoría de los hongos filamentosos patógenos para los humanos presentan sensibilidad *in vitro* frente a ella (Espinell-Ingroff *et al.*, 1997). La CMI exacta de anfotericina B en *S. prolificans* es muy elevada (100 µg/ml) (Resultados 2.1.1.). Todas las cepas ensayadas mostraron la misma resistencia *in vitro*, y no se encontró ninguna diferencia entre las cepas de origen clínico y las de origen ambiental. Estos resultados condujeron a la elección de una sola cepa (la cepa tipo) para realizar el resto de pruebas de sensibilidad a antifúngicos.

El ensayo de *curvas de muerte* se realizó con diversas concentraciones de anfotericina B (Resultados 2.1.2.). La existencia en *S. prolificans* de una CMI de anfotericina B tan elevada impidió utilizar concentraciones superiores, como suele hacerse en este tipo de pruebas (Eliopoulos y Moellering, 1996). La actividad fungicida de la anfotericina B frente a las esporas de *S. prolificans* fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Sólo se ha encontrado un efecto relevante de la anfotericina B a la concentración más alta (100 µg/ml), tanto a las 24 como a las 48 h. Por debajo de las 24 h de exposición el porcentaje de muerte es bajo, y puede deberse a la inicial inactividad metabólica de las esporas. Cuando las esporas germinan y producen hifas, aumenta su actividad metabólica y por lo tanto el porcentaje de mortalidad. La disminución tras 24 h de exposición a 100 µg/ml del número de unidades formadoras de colonias en casi 1 logaritmo, es indicativa de muerte (Eliopoulos y Moellering, 1996). Luego, en *S. prolificans*, coincidiría la CMI con la CMF de anfotericina B.

La aparente detención del crecimiento obtenida en ausencia o con concentraciones bajas de anfotericina B puede deberse a la agrupación de los tubos germinales. Cuando las conidias germinan, producen hifas, que habitualmente se reúnen formando agrupaciones

que son difíciles de separar en células individuales por agitación. Como resultado, una colonia puede haberse originado a partir de un grupo de hifas dando lugar a un aparente retraso en el crecimiento. Este problema se reduce significativamente en presencia de cantidades elevadas de anfotericina B, que inhibe el crecimiento con lo que las esporas se pueden resuspender con más facilidad. Este hecho también se ha observado en las curvas de mortalidad de *Aspergillus* sp. frente a anfotericina B (Hughes *et al.*, 1984). A pesar de ello, se debe mencionar que las curvas son bastante reproducibles, como se puede deducir de la gráfica de las desviaciones estándar (Resultados 2.1.2.). La desviación está en casi todos los puntos por debajo de 0,15. En definitiva, las curvas de muerte constituyen una prueba más de la resistencia a anfotericina B de esta especie.

La eficiencia de plaqueo se probó a una concentración de anfotericina B subinhibitoria para el crecimiento (10 µg/ml). A esta concentración no se encontró ningún efecto de la anfotericina B sobre colonias individuales de *S. prolificans*. Este es un dato más a añadir, que no resultó extraño después de haber obtenido las curvas de mortalidad.

La comprobación del *daño celular* consistió en un ensayo de naturaleza distinta. Como ya se ha mencionado, esta prueba es un reflejo del deterioro celular pero no necesariamente de los efectos letales de los antifúngicos (Meshulam *et al.*, 1995). Este experimento puede servir como una información complementaria de la acción de los antifúngicos, pero su empleo habitual está limitado por la laboriosidad que requiere. Sorprendentemente, el porcentaje de hifas dañadas por la acción de la anfotericina B a concentraciones subinhibitorias (10 µg/ml) fue bastante elevado (Resultados 2.1.4.). Se trata de un valor relativo, ya que los hongos pueden continuar creciendo por otros mecanismos y por otros segmentos de hifas que no estén afectados por el antifúngico. Del resultado obtenido se puede deducir que las células más resistentes de *S. prolificans* son las esporas. Esta hipótesis coincidiría con diversos estudios publicados sobre hongos filamentosos, fundamentalmente dematiáceos, en los que se describe que las esporas se acantonan en los tejidos y pueden filamentar y producir nuevas esporas (Perfect y Schell, 1996).

La explicación que se puede sustraer de los estudios realizados sobre la causa de la resistencia a anfotericina B en *S. prolificans* es que debe estar relacionada con características estructurales intrínsecas del propio hongo. No se ha descrito la existencia de ninguna otra especie patógena que sea multirresistente de manera intrínseca a todos los antifúngicos, especialmente a la anfotericina B. Una de las posibles interpretaciones sería

la presencia de melanina en sus paredes celulares. Pero los estudios realizados con mutantes albinos y antifúngicos (Resultados 5.1.2.) no parecen relacionar estas dos características. Aunque esto no quiere decir que la melanina no pueda ser un factor de virulencia como ocurre con *Wangiella dermatitidis* (Polak y Dixon, 1989). La relación entre la melanina y *S. prolificans* se discute con detenimiento en un apartado específico de esta Memoria de Tesis doctoral.

Otra posible explicación a la “insensibilidad” a los antifúngicos de *S. prolificans* estaría en la propia naturaleza de su pared celular. La resistencia sería un fenómeno de impermeabilidad que impediría la entrada de un gran número de sustancias al interior del microorganismo. Enlazando con la hipótesis anterior, la melanina sí que parece conferir una gran fuerza a las paredes fúngicas (Wheeler y Bell, 1988). Diversos resultados obtenidos en este trabajo nos hacen considerar esta hipótesis. Uno de ellos es la gran resistencia de *S. prolificans* a las enzimas líticas (datos que no se muestran): resultó imposible obtener protoplastos de *S. prolificans* bajo ninguna condición ensayada. El hecho de que sea resistente a antimicrobianos con distintos sitios de acción apunta también a esta posibilidad. También se obtiene poca cantidad de DNA por el procedimiento de ruptura mecánica de la pared celular (Métodos 4.2.), en comparación con otros hongos filamentosos como *Aspergillus* sp. (Holden, 1994) e, incluso, con *S. apiospermum*. Al ser las paredes celulares el primer sitio de interacción entre las células fúngicas y el medio ambiente, no resultaría extraño que estas desempeñen un papel principal en la resistencia de *S. prolificans* a los antifúngicos.

2. 1. ALTERNATIVAS AL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA

La actividad de los antimicrobianos ensayados frente a *S. prolificans* en las pruebas rápidas de macrodilución fue prácticamente nula (Tabla 9 de Resultados 2.2.1.). En realidad, este esquema de macrodilución se hizo para escoger las concentraciones apropiadas y probarlas en combinación, especialmente con la anfotericina B. Se examinó la actividad de un grupo muy variado de compuestos, aparte de los antifúngicos habituales. Principalmente, de inhibidores de la síntesis de proteínas: cloranfenicol, tetraciclinas (tetraciclina y minociclina), eritromicina y aminoglicósidos que actúan en el proceso de traducción y elongación (gentamicina, paromomicina e higromicina B). También se ha ensayado la actividad de antibacterianos inhibidores de la RNA polimerasa como la rifampicina. Estos compuestos se eligieron por comparación con estudios

realizados con *Aspergillus* (Hughes *et al.*, 1984; McGinnis y Rinaldi, 1996; Clancy *et al.*, 1998). Además se ha analizado la actividad de ciertos antifúngicos no empleados en la actualidad, como la cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas), la pneumocandina (inhibidor de la síntesis de los glucanos de la pared celular), la nikomicina (inhibidor de la síntesis de la quitina de la pared celular) y las sordarinas (inhibidores del factor de elongación 2 (EF2) de la síntesis de proteínas fúngicas). Finalmente, también se han evaluado las actividades de inhibidores de la síntesis de melanina como el triciclazol y la cerulenina (este último también actúa sobre la síntesis de ácidos grasos). Lo único que merece la pena destacar es la actividad de la cerulenina y la pneumocandina. La cerulenina presenta habitualmente este comportamiento frente a los hongos dematiáceos (Polak y Dixon, 1989). Es interesante la inhibición de *S. prolificans* causada por la pneumocandina a 100 µg/ml, aunque esta concentración sigue siendo muy alta como para pensar en su utilización con fines terapéuticos. La cicloheximida también actúa sobre *S. prolificans*, como ya estaba descrito (Malloch y Salkin, 1984).

Respecto a las combinaciones de antimicrobianos, los resultados fueron desalentadores (Resultados 2.2.1.). Entre aquellas que en macrodilución eran positivas u ofrecían dudas, sólo cicloheximida-anfotericina B fue claramente sinérgica. No obstante, es necesario resaltar que la interpretación de los resultados es crítica. Una combinación se define como sinérgica cuando está significativamente por debajo de la línea aditiva de un isoblograma. El margen de error de estos estudios es ± 1 dilución y, por lo tanto, una combinación debe estar, por lo menos, dos diluciones por debajo de la línea aditiva del isoblograma para ser claramente sinérgica, y, por lo menos, dos diluciones por arriba para ser significativamente antagonista. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el perfil de la curva de cicloheximida-anfotericina B obtenida por el método del tablero de ajedrez, fue claramente sinérgico (figura 8 de Resultados 2.2.2.), lo que llevó a la realización de otro tipo de experimentos para analizar con más profundidad diferentes aspectos de esta combinación. El resto de las curvas tienen un perfil dudoso y la elevada resistencia de *S. prolificans* a alguno de los inhibidores ensayados (miconazol y triciclazol) hace muy difícil la interpretación. La curva higromicina B-anfotericina B tiene un perfil sinusoidal y constituye un ejemplo de la inexistencia de curvas dosis-respuesta lineales (Eliopoulos y Moellering, 1996). Un perfil muy similar se obtuvo de tres experimentos con la combinación cicloheximida-nistatina y el resultado fue insólito si se considera el perfil claramente sinérgico obtenido con la anfotericina B.

La ventaja de las *curvas de mortalidad* es que miden la actividad fungicida de la combinación ensayada, además de la visión dinámica que ofrecen. La cicloheximida a concentraciones subinhibitorias para el crecimiento (10 $\mu\text{g/ml}$) produce una curva de muerte muy similar a las producidas por la anfotericina B con concentraciones equivalentes (figuras 6 y 13 de Resultados 2.1.2. y 2.2.3.). Entre las diversas combinaciones de cicloheximida a 10 $\mu\text{g/ml}$ y anfotericina B, se va observando un progresivo efecto sinérgico a las 48 h al ir aumentando la concentración de anfotericina B. Una reducción clara de 1 logaritmo en las curvas se produce con las combinaciones cicloheximida 10 $\mu\text{g/ml}$ y anfotericina B 10 $\mu\text{g/ml}$; y cicloheximida 10 $\mu\text{g/ml}$ y anfotericina B 100 $\mu\text{g/ml}$. Esta disminución apunta a una potenciación de la actividad de los antifúngicos en combinación, pero no a un evidente sinergismo. Resulta muy llamativo que en estas curvas sólo se aprecie el sinergismo a tiempos tan elevados. Esto puede deberse al retraso que produce la cicloheximida en la germinación de las esporas (Salkin, 1975) que haría que la acción de la anfotericina B no se manifestara hasta las 48 h. La diferencia entre los resultados obtenidos con el método del tablero de ajedrez y los originados por las curvas de muerte se debe a que no miden lo mismo: ofrecen una visión estática y dinámica, respectivamente.

La evaluación del *daño celular* producido por las combinaciones de cicloheximida y anfotericina B exigió en primer lugar la realización del experimento sólo con cicloheximida (apartado 2.2.4. de Resultados 2). La cicloheximida, con las mismas concentraciones que la anfotericina B, produce un daño celular mayor sobre las hifas. El efecto de las combinaciones es más aditivo que sinérgico: se suman los porcentajes de daño celular. La combinación cicloheximida y anfotericina B (ambas a concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$) produce un daño celular de casi el 55 %, que es casi la suma de los efectos por separado, pero no representa un gran daño celular. Esta potenciación de los efectos sobre las hifas de *S. prolificans* es muy interesante, porque demuestra que ambos antifúngicos realmente penetran en las hifas, lo que no quiere decir que lo hagan en las esporas.

Las posibles interpretaciones del sinergismo entre cicloheximida y anfotericina B son diversas. Es probable que concentraciones pequeñas de cicloheximida penetren en la célula. Luego una alteración de los componentes de la membrana puede afectar, probablemente por la vía de anomalías en el transporte, a la sensibilidad a cicloheximida. Esta alteración producida en la membrana puede favorecer su interacción con la anfotericina B, y por lo tanto, la actuación del antifúngico. Pero el hecho de que la combinación de otros antifúngicos con cicloheximida no sea sinérgica, induce a pensar que la anfotericina B también afecta de alguna manera a *S. proliferans* (hipótesis que confirman los experimentos de daño celular). Debe existir algún tipo de acción de la anfotericina B sobre la membrana o la pared celular de *S. proliferans* que favorece la actuación de la cicloheximida. Ambos antifúngicos tienen distintos sitios y mecanismos de acción por lo que el sinergismo entre ambos es plausible. En cualquier caso, hay que ser cautelosos con respecto al éxito de esta combinación, ya que los experimentos complementarios de curvas de muerte y daño celular no muestran un sinergismo tan claro.

No obstante, de los resultados obtenidos se puede inferir que algunas etapas de la síntesis de proteínas en *S. proliferans*, pueden constituirse en nuevas dianas para la búsqueda de antifúngicos o, al menos, nuevas combinaciones.

En un futuro se podrían evaluar combinaciones de antifúngicos e inmunomoduladores. Esta posibilidad ya ha sido mencionada en estudios previos (Alvárez *et al.*, 1995) y el hecho de que exista un caso en el que el enfermo se curó de la infección diseminada por *S. proliferans* al salir de la neutropenia (Berenguer *et al.*, 1997) hace factible esta hipótesis. También podría resultar interesante la evaluación de combinaciones de tres antifúngicos sobre este hongo.

3. LA MELANINA. FACTORES DE VIRULENCIA DE *S. prolificans*

La naturaleza molecular de las mutaciones causadas por la exposición a la luz UV depende de la acción mutagénica y de la reparación del DNA dañado. La exposición a la luz UV induce mutaciones puntuales, duplicaciones, inserciones y deleciones debidas a la absorción directa de la luz por las bases del DNA. Puede, además, producir otros resultados como recombinación mitótica (Carlton y Brown, 1981). En el presente trabajo se ha encontrado que la radiación de *S. prolificans* con luz UV induce, con alta frecuencia, cambios en la morfología de las colonias. En contraposición, la irradiación no condujo a la obtención de mutantes resistentes a cicloheximida (Resultados 5.1.2). La inducción de cinco fenotipos albinos distintos por la acción de la luz UV, fue reproducible y dependiente de la cepa. Esta situación se ha descrito para otro hongo filamentoso (*Sporothrix schenckii*) (Torres-Guerrero y Arenas-López, 1998).

La alta mutabilidad de *S. prolificans* no puede ser explicada satisfactoriamente por mutaciones puntuales ni por el desarrollo de una modulación de la expresión génica. De nuestros experimentos se pueden extraer dos preguntas: ¿cómo se ven afectados los diferentes *loci* implicados? Y ¿por qué se inducen los mismos cinco fenotipos albinos en dos experimentos distintos? La ausencia de un ciclo sexual conocido en *S. prolificans*, impide la realización de análisis genéticos de complementación. Para la repetición de los fenotipos, se podría pensar que hay una parte de la cromatina en el genoma de las esporas más sensible a la luz UV. La inducción de fenotipos morfológicos por la luz UV y su herencia es consistente con un sistema de recombinación mitótica en las variables estables (Davis y De Serres, 1970; Torres-Guerrero y Arenas-López, 1998). Las variables que revierten al fenotipo salvaje deben ser generadas por otro tipo de mecanismos. Estos mecanismos pueden comprender reorganizaciones genómicas o transposiciones.

El mecanismo de generación de variantes morfológicas en *S. prolificans* debe ser diferente al de levaduras (Torres-Guerrero y Arenas-López, 1998). Primero, la mutación espontánea no se produce, incluso después de una exhaustiva búsqueda con diferentes cepas (Resultados 5.1.1.); se necesita la inducción por luz UV. En segundo lugar, no había conversión entre los fenotipos de *S. prolificans*; la reversión fue directa al fenotipo salvaje. En levaduras como *Candida albicans* hay una conversión o “switching” constante entre fenotipos. Una situación semejante se da en el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii* (Torres-Guerrero y Arenas-López, 1998) y en *Aspergillus fumigatus* (Jahn *et al.*, 1997).

El hecho de que *S. proliferans* en presencia de tricloclazol cambie el color de su micelio de negro a marrón, confirma la sospecha de que la melanina en *S. proliferans* es del tipo dihidroxinaftaleno (Resultados 3.6.). Este tipo de melanina es la común en los hongos filamentosos dematiáceos (Wheeler y Bell, 1988), se sintetiza vía metabolismo y se deposita en las paredes celulares.

De forma complementaria, se ha querido investigar la hipótesis de que la melanina es responsable de la resistencia a antimicrobianos en *S. proliferans*. El haber podido conseguir mutantes deficientes en la síntesis de melanina facilitaba el estudio de esa hipótesis. Los mutantes albinos deberían ser más sensibles a los antifúngicos que la cepa salvaje con melanina. Los antifúngicos ensayados representaban dos polienos (anfotericina B y nistatina), un antimetabolito de la síntesis de ácidos nucleicos (5-fluorocitosina), un imidazol (ketoconazol) y un triazol (itraconazol) y un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida). No se encontró un aumento de la actividad antifúngica en asociación con una clase específica de antifúngico (Tablas 16 y 17 de Resultados 5.1.2.). Las CMI's obtenidas estaban dentro de valores de resistencia similares a los de la cepa salvaje. En uno de los mutantes (Mel-1) las pruebas de sensibilidad realizadas por la técnica de microdilución podían ofrecer alguna duda. No obstante, la sensibilidad a anfotericina ensayada por la técnica de dilución en agar dio lugar a unos valores muy similares a los de la cepa salvaje (Resultados 5.1.2.4.). Quizás la diferencia de tasa de esporulación y crecimiento sea la explicación a estos resultados. En otro hongo filamentoso dematiáceo (*Wangiella dermatitidis*) se ha encontrado una situación similar (Polak y Dixon, 1989)

Otros factores putativos de virulencia analizados son la termorresistencia, velocidad de crecimiento y dimorfismo (Resultados 3). La tasa de crecimiento de *S. proliferans* es mayor a 35°C que a 25 y 30°C, lo que podría favorecer su diseminación en los tejidos humanos (Resultados 3.2.). Aunque, en general, no se ha encontrado ninguna característica especial que pudiera afectar a la virulencia de *S. proliferans*. Además, el comportamiento de las cepas de origen clínico y las de origen ambiental es idéntico en cuanto a su velocidad de crecimiento a distintas temperaturas (Resultados 3.3.). *S. proliferans* no mostró transición a una fase levaduriforme en ninguno de los medios probados (Resultados 3.5).

4. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *S. prolificans*

La incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado notablemente durante las dos últimas décadas. La aparición de nuevos fármacos que evitan el rechazo del órgano transplantado, los nuevos anticancerígenos y antimicrobianos, así como las nuevas técnicas quirúrgicas, permiten luchar contra procesos que antes tenían una mortalidad elevada. La mayoría de los tratamientos que se realizan contra la enfermedad primaria inducen una inmunosupresión en el paciente que propicia una sensibilidad extrema a cualquier microorganismo. Por estas razones, las micosis han emergido como una complicación importante de estos procesos, y los hongos, que estaban considerados como “curiosidades microbiológicas”, aparecen en la actualidad como patógenos humanos oportunistas.

Además, se han descrito, durante los últimos 5-10 años numerosos casos de posibles brotes de infecciones fúngicas nosocomiales causadas por hongos filamentosos (Pfaller, 1995; Perfect y Schell, 1996). Casi toda la información existente atribuye a *Aspergillus* la etiología de la mayor parte de las infecciones nosocomiales (Birch *et al.*, 1995; Latgé *et al.*, 1998). Sin embargo, en los últimos años estamos asistiendo a la identificación de otros hongos filamentosos como causantes de infecciones similares. Los principales hongos filamentosos patógenos incluyen: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Paecilomyces* sp., *Rhizopus* sp. y los hongos dematiáceos *Scedosporium prolificans*, *Alternaria* sp., *Wangiella dermatitidis* y *Phialophora* sp. (Perfect y Schell, 1996). En todos estos trabajos se subraya la necesidad de entender la epidemiología de la infección fúngica.

En nuestro entorno, se puede considerar a *S. prolificans* como un patógeno fúngico emergente. Cada vez son más los episodios reseñados en que causa infecciones del torrente sanguíneo (Berenguer *et al.*, 1997), y además se están empezando a notificar brotes de infección nosocomial (Alvárez *et al.*, 1995).

Los perfiles clínicos y patológicos de las infecciones diseminadas producidas por *S. prolificans* son muy parecidos a los de otras micosis diseminadas (Berenguer *et al.*, 1997). La implicación de los pulmones no difiere de la observada habitualmente en otras infecciones invasoras causadas por hongos filamentosos. En estos casos, los síntomas clínicos y las radiografías de tórax sugieren transmisión aérea (Berenguer *et al.*, 1997). Se ha descrito la colonización respiratoria producida por *S. prolificans* (Wood *et al.*, 1992; Berenguer *et al.*, 1997), con lo cual es posible especular que se produce una colonización

pulmonar seguida de una diseminación de la infección en el torrente sanguíneo, todo ello inducido por una severa neutropenia.

Siempre hay un consenso acerca de la exposición al medio ambiente y la adquisición de infecciones por hongos filamentosos (MacNeil *et al.*, 1995). Por consiguiente, la habilidad de tipificar cepas por métodos moleculares es importante en las investigaciones de posibles brotes nosocomiales de infecciones fúngicas y para diferenciar las recaídas de las reinfecciones con determinados aislados clínicos. Los métodos genotípicos se han empleado para estudiar relaciones entre cepas de una misma especie de diferentes hongos filamentosos (Taylor *et al.*, 1999). Las infecciones diseminadas producidas por *A. fumigatus* son, entre los hongos filamentosos, las más analizadas (Birch *et al.*, 1995; Latgé *et al.*, 1998). Los métodos moleculares han sido utilizados para estudiar relaciones de aislados diferentes de *Aspergillus*, con el objetivo de diferenciar cepas, haciendo así factible la búsqueda de los orígenes de las infecciones y la adquisición de medidas preventivas.

El enorme conjunto de datos epidemiológicos y moleculares que se poseen de las infecciones producidas por *A. fumigatus*, hacen que se le pueda tomar como modelo para la investigación de las infecciones causadas por *S. prolificans*. En el caso de brotes nosocomiales de aspergilosis pulmonar invasora, algunas veces asociados con obras en edificios (Walsh y Dixon, 1989), se ha sugerido que puede haber un gran reservorio de cepas diferentes en el aire (Girardin *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1994; Chazalet *et al.*, 1998). Así pues, resultaría inesperado que en cada paciente, la responsable de la enfermedad sea una única cepa. También las conclusiones de los estudios de tipificación de *A. fumigatus* sugieren que cada caso de aspergilosis puede ser debido a cepas de más de un tipo molecular (Loudon *et al.*, 1993; Chazalet *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1999). Este conjunto de resultados conduce a especular sobre la infección por *A. fumigatus*: ¿el enfermo está inicialmente expuesto a múltiples cepas o se produce una exposición secuencial que conduce a una superinfección por una segunda cepa, o bien la variación genotípica se produce *in vivo*? (Loudon *et al.*, 1993).

S. prolificans es un hongo resistente a todos los antifúngicos disponibles en la actualidad (Cuenca-Estrella *et al.*, 1999). Las infecciones causadas por *S. prolificans* son, en pacientes inmunosuprimidos, fatales, con evolución rápida y difíciles de diagnosticar (Berenguer *et al.*, 1997). Además el tratamiento óptimo es desconocido. Por lo tanto, la prevención es incluso más importante que en otras infecciones fúngicas y los métodos genotípicos de tipificado de cepas ambientales, colonizadoras e invasoras pueden

desempeñar un papel muy importante en el discernimiento de la epidemiología de las infecciones causadas por *S. prolificans*.

4.1. METODOS APLICADOS PARA CARACTERIZAR CEPAS DE *S. prolificans*

Las técnicas genotípicas basadas en los polimorfismos del DNA son, en comparación con los sistemas fenotípicos, más estables y fiables. Además, permiten cuantificar la distancia evolutiva entre poblaciones.

Los métodos de tipificado basados en la PCR son, entre el gran número de técnicas disponibles para tipificar a nivel subespecífico, unas herramientas epidemiológicas muy útiles. Se han aplicado con gran éxito a muchas especies de hongos patógenos (Mitchell *et al.*, 1994; Pfaller, 1995; Taylor *et al.*, 1999). Estos sistemas deben ser rigurosamente evaluados antes de proceder a su utilización (Kerr, 1994; Weising *et al.*, 1995).

En la presente memoria se describe la aplicación de las técnicas de RAPD y “PCR-fingerprinting” a la caracterización de cepas de *S. prolificans*. Estos métodos son los más útiles en casos como éste en que no se conoce apenas nada de la biología molecular de la especie. Además, como ya se ha explicado, son rápidos, sencillos y se necesita muy poco DNA para aplicarlos.

Lo primero que se debe juzgar en un sistema de caracterización subespecífica es su tipificabilidad y capacidad de discriminación. Esto se ha logrado con los iniciadores de RAPDs GC70 y GC80, así como con el iniciador M13 en “PCR-fingerprinting”. La tipificabilidad fue del 100%, ya que las dos técnicas ensayadas consiguieron asignar un patrón molecular a todas las cepas incluidas en este estudio.

En el trabajo de San Millán *et al.* (1997), no se logró, con un único iniciador, diferenciar 6 cepas de distinto origen geográfico. Por lo tanto, estaba fallando una de las premisas imprescindibles de cualquier sistema de tipificado: “la capacidad de discriminación”. En nuestro trabajo, por el contrario, las técnicas de RAPD y “PCR-fingerprinting” consiguen distinguir con un solo iniciador cepas de diferente origen, aunque parece que los tipos moleculares de cepas del mismo hospital están más relacionados (ver los hospitales F y G de la Tabla 12 y la figura 20 en Resultados 4). Esta observación sugiere que pueda existir un menor grado de diversidad genética relacionado con cepas de la misma localidad. Esta situación es, probablemente, la que ha acontecido en el estudio citado (San Millán *et al.*, 1997), ya que de las 6 cepas empleadas para evaluar la capacidad de discriminación, 3 procedían del mismo hospital. En cualquier

caso, con su sistema de tipificado mediante RAPDs, necesitan al menos tres iniciadores para distinguir cepas no relacionadas epidemiológicamente. Nosotros hemos concluido que la técnica de RAPD con los iniciadores GC70 o GC80 logra diferenciar cepas de diferente origen geográfico (Resultados 4.1.), aunque GC80 alcanza un mayor grado de discriminación que GC70. La técnica de “PCR-fingerprinting” con la secuencia central del fago M13, también logra distinguir cepas de *S. proliferans* con un grado similar a GC80 en cuanto al número de patrones, pero mayor en cuanto a las diferencias entre cepas de distintas localidades (Tabla 12 de Resultados 4.2.).

El tercer aspecto analizado fue la reproducibilidad de los métodos. Aquí es donde se encontraron más problemas. Con las dos técnicas se logran patrones reproducibles a partir de diferentes muestras de DNA de la misma cepa en un período de tiempo limitado (aproximadamente un año). Pero cuando se intentó repetir el ensayo al cabo de los años, se encontraron variaciones entre los perfiles electroforéticos antiguos y los nuevos. Es decir, existe una gran sensibilidad de los patrones a pequeños cambios en las condiciones de reacción. Este hecho, que ya estaba descrito en la literatura (Kerr, 1994; Power, 1996), constituye una limitación muy importante. Con la técnica de “PCR-fingerprinting” se obtuvo una reproducibilidad mejor en el tiempo que con la de RAPD. No obstante, había algunos fragmentos de elevado tamaño molecular (> 3 kb) que se perdían, lo cual confirmaba la existencia de una cierta inespecificidad de la unión del iniciador al DNA molde, y por lo tanto, una similitud con los RAPDs (Weising, 1995).

Esta falta de reproducibilidad hace que no se recomienden estas técnicas como definitivas para la caracterización subespecífica de *S. proliferans*, pero no impide que se puedan emplear como técnicas comparativas. La realización de una estricta estandarización, empleando siempre controles adecuados, permite su aplicación durante la investigación de epidemias locales en las que se analicen todas las muestras de forma simultánea o en un intervalo de tiempo limitado.

En conclusión, ambos métodos son apropiados para el estudio de *S. proliferans*, aunque la técnica de “PCR-fingerprinting” presenta un poder de discriminación y una reproducibilidad ligeramente superiores a los RAPDs. El método que dé el mejor resultado es el que debe ser seleccionado y, al mismo tiempo, se deben probar combinaciones con el objeto de comprobar si aumentan el poder discriminatorio.

No se ha encontrado ningún tipo molecular específico de las infecciones producidas por *S. proliferans*, lo que confirma la naturaleza oportunista de la infección. Los resultados obtenidos hasta ahora muestran una gran diversidad genética entre la población de

S. prolificans. El significado de esta diversidad genética, los mecanismos por los que transcurre y su relevancia en la patogenicidad están aún por establecer. Un mayor entendimiento de las bases moleculares de estos sucesos y de los factores responsables de su inducción, puede llegar a esclarecer la relación entre *S. prolificans* y las enfermedades que causa.

4.2. APLICACION AL ESTUDIO DE BROTES DE INFECCION NOSOCOMIAL

4.2.1. Brote número 1

Los cuatro casos investigados se diagnosticaron en una sola institución en un periodo de tiempo de un mes. No se encontraron cepas de *S. prolificans* en el aire, lo cual no quiere decir que no estuviera presente; quizás no se buscó en el lugar apropiado. Sin embargo, las evidencias circunstanciales sugerían que se trataba de una epidemia nosocomial. En el hospital no aparecieron más casos de infección por *S. prolificans*, después de los ya referidos (Alvárez *et al.*, 1995).

Los resultados del estudio molecular de este brote son complejos (Ruiz-Díez *et al.*, 1997). No obstante, constituyen un buen ejemplo para glosar los diferentes hechos que podrían concurrir en las infecciones diseminadas producidas por *S. prolificans*.

El origen nosocomial de la infección sería posible en el caso de los aislados números 1 y 3 que comparten el mismo tipo molecular (Tabla 12 de Resultados 4.2.) y cuyos respectivos pacientes (casos 1 y 3; Alvárez *et al.*, 1995) habían estado simultáneamente hospitalizados. Pero no se puede concluir que esta cepa se originara en un paciente para luego infectar al otro, ya que estos enfermos no compartían la misma habitación (Alvárez *et al.*, 1995). Los aislados 2 y 4 pertenecen a dos pacientes que también estaban ingresados en la misma unidad al mismo tiempo, pero han resultado ser genotípicamente diferentes (Tabla 12 en Resultados 4.2.). Si estos enfermos se contagiaron en el hospital, la infección se debió a dos cepas distintas que estaban contaminando el ambiente hospitalario. Otra posibilidad consistiría en que los pacientes hubieran llegado al hospital colonizados y la infección se manifestase después de alcanzar el estado neutropénico. Esta premisa nos podría llevar a una conclusión más general: cada paciente estaba infectado por su propia y específica cepa, la cual debería ser lógicamente distinta en cada uno, ya que los enfermos proceden de diferentes localidades geográficas.

En resumen, se pueden dar varias explicaciones para los resultados del tipificado del brote nº1 de *S. prolificans* producido en 4 enfermos leucémicos (Alvárez *et al.*, 1995). Una de estas posibilidades sería que la infección tuvo un origen endógeno en dos pacientes (aislados 2 y 4 en la Tabla 12 de Resultados 4.2.) y para los otros dos pacientes el origen fue ambiental (aislados 1 y 3 en la Tabla 12 de Resultados 4.2.). Otra posibilidad sería que las tres cepas genotípicamente diferentes fueran sólo una muestra del gran reservorio de cepas presentes en el medio ambiente hospitalario. Es decir, las tres cepas se seleccionaron al azar entre el gran número de cepas presentes en el aire. Finalmente, los cuatro pacientes pudieron haber estado infectados por múltiples cepas y sólo fue aislada y tipificada una de ellas en cada caso. Esta última explicación es la menos probable, ya que en otros estudios se ha encontrado siempre el mismo tipo molecular en aislamientos secuenciales de un mismo paciente (San Millán *et al.*, 1997).

4.2.2. Brote número 2

Este es el segundo caso en España de un brote hospitalario de infecciones diseminadas causadas por *S. prolificans*. Los aislados tipificados se identificaron en un periodo de cuatro meses. En esta ocasión si se encontraron muestras de *S. prolificans* en los conductos de ventilación del hospital. Es importante resaltar la presencia del hongo, incluso después de 2 meses del último caso diagnosticado. Esta situación ya se había descrito en brotes nosocomiales de infección causados por *A. fumigatus* (Girardin *et al.*, 1994; Chazalet *et al.*, 1998).

Como se describe en el apartado 4.3. de Resultados, antes de proceder a la caracterización molecular de las cepas de este nuevo brote se llevó a cabo una nueva puesta a punto del método. En esta ocasión la tipificación se llevó a cabo sólo mediante la técnica de “PCR-fingerprinting”. Esta técnica era la más reproducible (como ya estaba descrito en la literatura), y los resultados paralelos de RAPD no habían aportado ningún resultado nuevo a la caracterización del brote número 1.

Este brote representa el típico caso en el que las pruebas genotípicas sirven como confirmación de la sospecha de la relación existente entre la infección y el medio ambiente hospitalario. Las cepas de los 4 enfermos resultaron ser idénticas (Tabla 13 y figura 21 en Resultados 4.3.), obteniéndose como resultado un solo tipo molecular. El aislamiento del mismo tipo en, al menos, una de las cepas ambientales (aislado 5 en la Tabla 13), sugiere

que el mecanismo de transmisión del "presunto" brote fue la vía aérea. Es importante resaltar que esta cepa estuvo presente en la unidad después de dos meses.

Así pues, el origen de las infecciones parece ser ambiental en los cuatro enfermos que comparten un tipo molecular idéntico. Las explicaciones para estos resultados incluyen la posibilidad de que *S. prolificans* se introdujera en el hospital a través del aire. Esta cepa se podría haber seleccionado por casualidad, entre un número mayor de cepas presentes en el ambiente hospitalario, donde se encontraron al menos dos tipos muy parecidos.

En conclusión, se puede demostrar la existencia de enfermedades nosocomiales causadas por *S. prolificans*, tomando muestras simultánea o próximamente a la estancia y fecha de muerte del paciente. Los métodos genotípicos pueden confirmar el origen de las infecciones.

5. TRANSFORMACION GENETICA DE *S. prolificans*

En este trabajo se ha desarrollado un sistema de transformación para *S. prolificans*. La transformación por electroporación de esta especie hace posible su manipulación genética en un sentido en el que hasta el momento no era posible.

5.1. TRANSFORMACION CON EL MARCADOR DE RESISTENCIA A HIGROMICINA B

Para desarrollar un sistema de transformación se eligió un marcador de selección dominante: el gen *hph* de *E. coli*. Este gen se encontraba acoplado a un promotor y a un terminador de *Aspergillus nidulans* dentro del cósmido pMLF2 (An *et al.*, 1996). La existencia de numerosos trabajos de transformación de diferentes hongos filamentosos con este marcador, hacía confiar en el éxito de su empleo para *S. prolificans*. Asimismo, es importante resaltar que se trata de un cósmido descrito como apropiado para transformar hongos ascomicetos. Además, la elección de este vector se basó en su posible uso para construir librerías genómicas, "caminar" en los cromosomas y la rapidez con que se pueden hacer mapas de los insertos de DNA. *S. prolificans* puede ser realmente transformado con este vector (Ruiz-Díez y Martínez-Suárez, 1999). Cualquier cepa de *S. prolificans*, sin acudir a la mutagénesis, podría ser empleada como receptora en la transformación con este marcador de resistencia.

Por otra parte, el método escogido para transformar a *S. prolificans* fue la electroporación. Uno de los motivos por los que se eligió este método fue las enormes dificultades que suponía la formación de protoplastos: realmente no se ha conseguido la digestión de la pared celular de *S. prolificans*. La electroporación, aparte de estar cada vez más extendida, permite la manipulación de células intactas y produce mayores frecuencias de transformación (Reis Bogo *et al.*, 1996).

Las mayores eficiencias de electroporación se obtuvieron con un campo eléctrico de 12,5 kv/cm, resistencia de 200 Ω y 25 μ F de capacidad. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que en estas condiciones sólo una pequeña fracción de células es electrocompetente. Se han considerado diversos factores para intentar mejorar la frecuencia de transformación (Resultados 5.2.3.). Uno de los factores que más influye en la eficiencia es la permeabilización de las células y confirma las observaciones previas sobre la potente barrera para la electroporación que constituye la pared celular de los hongos filamentosos (Chakraborty *et al.*, 1991; Ozeki *et al.*, 1994). *S. prolificans* necesita la combinación de las enzimas líticas β -glucuronidasa y quitinasa, que en realidad no afectan a la integridad de la pared celular ni a la viabilidad de las células, pero aumentan la obtención de transformantes. La enzima quitinasa actúa sobre la síntesis de la quitina de la pared celular, sin embargo la β -glucuronidasa tiene varias acciones (glucanasa, sulfatasa y probablemente otras). La contribución relativa de estas actividades enzimáticas a la permeabilización de la pared es difícil de comprobar ya que incluso componentes minoritarios pueden desempeñar un papel importante en la actividad global. La densidad de esporas a electroporar también parece ser bastante crítica, y por encima de un determinado valor ($7,5 \cdot 10^7$ esporas/ml) se alcanza la saturación. Este resultado también se produce cuando se electropora *Aspergillus niger* (Ozeki *et al.*, 1994). La sobreexpresión también resultó ser un factor importante: es imprescindible dejar a las células recuperarse durante un pequeño período de tiempo antes de proceder a la selección. La manipulación del campo eléctrico y la resistencia estaban restringidas por el máximo permitido por el instrumento empleado. El resto de variables analizadas (Resultados 5.2.3.) no parecieron influir mucho en la optimización del proceso.

Las frecuencias de transformación obtenidas con el vector pMLF2 y la cepa tipo de *S. prolificans* son bajas (Resultados 5.2.4.). No obstante, si se tiene en cuenta que se trata de un hongo filamentoso y que el vector posee un marcador de selección heterólogo, estas frecuencias se pueden considerar dentro de la normalidad (Riach y Kinghorn, 1996).

5.2. AUMENTO DE LA FRECUENCIA DE TRANSFORMACION CON EL VECTOR QUE CONTIENE rDNA DE *S. prolificans*

Una de las estrategias empleadas cuando no se conoce el genoma del hongo que se pretende transformar, es la introducción de secuencias conocidas en vectores heterólogos. Estas secuencias aumentan *a priori* la probabilidad de recombinación homóloga y, si además, se encuentran en múltiples copias en el organismo receptor, este aumento de la frecuencia debe ser aún más favorable. La región del rDNA correspondiente al gen 5,8S y a los espaciadores ITS I e ITS II ha sido estudiada con profundidad en esta Memoria con fines taxonómicos (Resultados 1) y cumplía los requisitos necesarios para su empleo en el sistema de transformación. Con ella fue construido el vector pSP1, específico para *S. prolificans* (Ruiz-Díez y Martínez-Suárez, 1999).

La frecuencia de transformación con pSP1 es mayor que con pMLF2. Cuando se transforma con pSP1 linearizado en la secuencia del rDNA, la frecuencia aumenta casi al doble (Tabla 18 de Resultados 5.2.4.). Este incremento del número de transformantes era esperado, pero resulta bajo si se compara con otros vectores parecidos construidos para el hongo filamentoso *Alternaria alternata* (Tsuge *et al.*, 1990). En este hongo cuando se construye un vector con los tres genes del rDNA (28S, 5,8S y 18S, con un total de 8,15 kb) la frecuencia de transformación aumenta 20 veces. Sin embargo, cuando estos mismos autores transforman con un vector que lleva 0,9 kb menos (correspondientes a un fragmento del gen 18S) las frecuencias ya no aumentan tanto, sólo 10 veces. La comparación de los resultados obtenidos con *S. prolificans* y los mencionados para *A. alternata* demuestra que cuanto más grande es la secuencia homóloga, mayor es la frecuencia de integración. Por otra parte, en *S. prolificans* pueden existir fragmentos del rDNA más favorables para una integración efectiva y que no han sido clonados. Una frecuencia mayor de integración podría lograrse seleccionando otros segmentos del rDNA, o con la misma región empleada pero añadiéndole algún segmento de los genes adyacentes 18S y 28S.

Es interesante destacar que la transformación con pSP1 linearizado dentro de la secuencia del rDNA produce un número más elevado de transformantes que cuando se linearizó en otro punto del vector (Resultados 5.2.4.). Parece que existe mayor integración cuando las secuencias homólogas son las que flanquean al plásmido lineal. Este resultado

coincide con otros previos de levaduras (Fincham, 1989; Rossolini *et al.*, 1992) y con los de *A. alternata* (Shiotani y Tsuge, 1995).

Otro dato importante que se sugiere en los trabajos realizados con *A. alternata* (Tsuge *et al.*, 1990) es que la dirección de los fragmentos del rDNA en el vector también puede afectar a la eficacia de transformación. En el caso del vector pSP1 (Resultados 5.2.2.1.), el fragmento clonado ITS1-5,8S-ITS2 se encuentra en la dirección opuesta al gen *hph*. Según señalan estos autores, esta orientación disminuye la eficacia de transformación aunque no explican el posible mecanismo para este fenómeno. Lamentablemente, no se obtuvieron vectores con el rDNA situado en la otra orientación, que hubieran hecho factible comprobar si esta situación también puede acontecer con *S. prolificans*.

5.3. ANALISIS DE LOS TRANSFORMANTES

Todos los transformantes analizados, independientemente de su origen, son resistentes a higromicina B y, además, conservaban esta característica incluso en condiciones no selectivas. El diseño de una sencilla y rápida PCR para detectar la presencia del gen *hph*, permitió una confirmación previa de la estabilidad mitótica (Resultados 5.2.5.2.). En resumen, el DNA transformante está integrado de manera estable en los cromosomas de *S. prolificans* durante todos los periodos de tiempo examinados (Ruiz-Díez y Martínez-Suarez, 1999). La integración cromosómica es característica de los hongos filamentosos (Clutterbuck, 1995).

Al ser *S. prolificans* un hongo imperfecto, la única manera de caracterizar genéticamente a los transformantes era por hibridación mediante el método de "Southern". Este análisis ha sido utilizado clásicamente para determinar el número de copias de las secuencias transformantes y establecer si el vector se replica autónomamente o si se integra en el cromosoma e, idealmente, el tipo de integración que ha sucedido (Riach y Kinghorn, 1996).

El destino del DNA transformante fue estudiado sólo con 13 transformantes que habían mostrado previamente su estabilidad mitótica. Las bajas frecuencias de transformación y la necesidad de obtener los transformantes del mismo experimento impidieron el análisis de un mayor número de transformantes. Los tres transformantes procedentes de la electroporación con pMLF2 fueron elegidos simbólicamente para su comparación con los diez originados por pSP1 (Resultados 5.2.5.3.).

El análisis de los transformantes por hibridación confirmó el estudio previo de la estabilidad mitótica: no se encontró ninguna prueba de la existencia de DNA extracromosómico (Resultados 5.2.5.3.).

Una característica muy importante de la transformación de *S. prolificans* es el hecho de que todos los sucesos analizados son integraciones sencillas: es decir, el DNA plasmídico se integra siempre en sus cromosomas en un lugar único. Este hecho no es muy frecuente en hongos filamentosos, donde en un mismo experimento suelen producirse integraciones en diferentes lugares de los cromosomas acompañadas de integraciones sencillas como en nuestro caso (Riach y Kinghorn, 1996). Además, se han encontrado integraciones en *tandem* en cuatro transformantes (Resultados 5.2.5.3.) que sí son características de los hongos filamentosos (Clutterbuck, 1995; Riach y Kinghorn, 1996). En realidad puede haber más integraciones en *tandem*, pero para saber si existen tendría que haberse realizado un análisis por densitometría, que no era accesible en ese momento.

Otra peculiaridad encontrada es la existencia de dos transformantes (pS4E y pS5E, Resultados 5.2.5.3) que presentaban una modificación o reorganización de las secuencias integradas, con el resultado de la pérdida de secuencias del plásmido transformante. Estas reorganizaciones del DNA transformante pueden ocurrir antes o después de la integración del DNA y han sido descritas previamente en hongos filamentosos (Rohe *et al.*, 1996). Ambos transformantes procedían de la transformación con pSP1 linearizado fuera de la secuencia del rDNA, lo que confirma la predisposición a estas reordenaciones cuando las secuencias flanqueantes no son las homólogas.

En cuanto al tipo de integración con pSP1, ésta parece ser principalmente ectópica, ya que no se encuentra el mismo fragmento en la hibridación de los transformantes (Resultados 5.2.5.3.). Entre los diez transformantes de pSP1, aparecen 5 tipos diferentes. Este resultado es claramente contradictorio, ya que al transformar con pSP1 lo lógico es que se favoreciera la recombinación homóloga. Sin embargo, uno de los tipos obtenidos, que corresponde claramente a la duplicación en *tandem*, aparece en tres transformantes y se repite con respecto a la transformación con pMLF2. En el sistema empleado con *Alternaria alternata* las integraciones observadas son segmentos ordenados en *tandem* (Shiotani y Tsuge, 1995). Sería necesario el análisis de un número mayor de transformantes para confirmar la predominancia de las integraciones ectópicas, ya que entre los diez transformantes señalados sólo seis proceden de un único experimento con pSP1-*Apal*. No obstante, parece que existe una cierta tendencia a la integración en determinados lugares cromosómicos: todos los tipos moleculares que aparecen al

transformar con pSP1 se repiten en, por lo menos, dos transformantes (Tabla 19 de Resultados 5.2.5.3.). Además, las integraciones sencillas son típicas de sistemas de recombinación homóloga (Fincham, 1989; Kwon-Chung *et al.*, 1998).

Otra explicación al tipo de integraciones observadas en *S. prolificans* estaría en la naturaleza del sistema escogido para su transformación, junto con la cepa empleada como receptora. En este caso la electroporación y la cepa tipo de *S. prolificans* (que no tiene ninguna modificación genética) pueden haber influido en el destino del DNA transformante.

En definitiva, se puede concluir que como consecuencia de la transformación con el vector creado pSP1, las copias del plásmido se han integrado de manera simple en un número limitado de sitios del genoma de *S. prolificans*. La ausencia de un sistema para separar los cromosomas de *S. prolificans* impide analizar si todos los sitios de integración pertenecen al *locus* del rDNA. Este hecho, que no ocurre en sistemas parecidos de otros hongos filamentosos, sí que ha sido encontrado en levaduras como *Kluyveromyces lactis* (Rossolini *et al.*, 1992). Los mecanismos de la recombinación homóloga o ectópica, la integración de muchas copias o la amplificación del plásmido empleado en *S. prolificans* permanecen sin identificar.

5.4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Una de las claves de los sistemas de transformación de hongos es la habilidad para examinar genéticamente la importancia de los factores putativos de virulencia. El sistema de transformación descrito para *S. prolificans* puede ser empleado para complementar funciones genéticas en cepas con un conocido defecto de virulencia, cuando dichos genes estén disponibles. Alternativamente, se puede emplear para sobreexpresar genes en cepas salvajes. Se requeriría una mejora sustancial del sistema para realizar otras aproximaciones genéticas al análisis de la virulencia. Habría que intentar manipular el o los vectores transformantes para favorecer una mayor extensión de la recombinación homóloga. Las posibles tácticas en la selección del DNA recombinante se citan en el apartado anterior. Estas estrategias son necesarias para conseguir una interrupción de genes o bien un reemplazamiento de éstos. Las integraciones al azar, no obstante, son también valiosas porque generan numerosos mutantes en distintas rutas biosintéticas (Riggle y Kumamoto, 1998). Igualmente, la frecuencia de transformación debería ser aumentada notablemente antes de complementar cepas de virulencia alterada con librerías

genómicas. Estas mejoras se pueden lograr con metodologías habituales de biología molecular. Los métodos presentados en esta Memoria deberían permitir comenzar el análisis genético de *S. prolificans*.

CONCLUSIONES

1. El análisis de la región del rDNA nuclear que comprende los dos espaciadores transcritos y el gen 5,8S (ITSI-5,8S-ITSII), mediante endonucleasas de restricción y secuenciación, ha confirmado la relación filogenética entre las dos especies de *Scedosporium* patógenas para el hombre (*S. prolificans* y *S. apiospermum*). El empleo de esta región como herramienta taxonómica ha permitido incluir a un hongo imperfecto como *S. prolificans* dentro de los hongos ascomicetos filamentosos.
2. Se ha estudiado la resistencia intrínseca de *S. prolificans* a todos los antifúngicos, y en particular a la anfotericina B, como la característica sobresaliente de esta especie. Se ha puesto de manifiesto de diversas maneras que la anfotericina B, incluso a concentraciones muy elevadas, es incapaz de destruir las esporas de *S. prolificans*. Como alternativa a este grave problema se han evaluado diferentes combinaciones de antimicrobianos, especialmente de anfotericina B con inhibidores de la síntesis de proteínas, encontrándose un resultado claramente sinérgico en el caso de la anfotericina B combinada con cicloheximida.
3. Si se exceptúan la resistencia a antifúngicos y la termorresistencia, no se han encontrado características particulares de *S. prolificans* que pudieran considerarse factores de virulencia. Tampoco la comparación de aislados clínicos y ambientales de *S. prolificans* ha revelado ninguna diferencia que pudiera afectar a su virulencia.
4. La amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) y la amplificación con iniciadores únicos dirigidos a secuencias de minisatélites de eucariotas ("PCR-fingerprinting") han sido empleadas para tipificar cepas de *S. prolificans* y para comprender la historia natural de las infecciones nosocomiales que produce. La técnica de "PCR-fingerprinting" presenta un poder de discriminación y una reproducibilidad ligeramente superiores a los de RAPD. Al estudiar dos brotes de infecciones hospitalarias causadas por *S. prolificans* se encontraron cepas iguales y diferentes dentro de cada hospital, situación que recuerda a las infecciones causadas por *Aspergillus*.
5. *S. prolificans* sintetiza melanina del tipo dihidroxinaftaleno. Mediante la luz ultravioleta se han aislado diferentes mutantes deficientes en la síntesis de melanina

que presentan el mismo grado de resistencia a los antifúngicos que la estirpe salvaje original.

6. Se ha desarrollado un método de transformación genética de *S. prolificans* por electroporación, empleando la resistencia a higromicina B como marcador de selección. Asimismo, se ha empleado la región del rDNA secuenciada previamente (ITSI-5,8S-ITSII) para construir un vector integrativo específico de *S. prolificans* y aumentar la frecuencia de transformación. La integración del DNA plasmídico en los cromosomas de *S. prolificans* es estable y principalmente aleatoria.

BIBLIOGRAFIA

- Alvárez M, López Ponga B, Rayón C, García Gala J, Rosón Porto MC, González M, Martínez-Suárez JV, Rodríguez-Tudela JL. 1995. Nosocomial outbreak caused by *Scedosporium prolificans* (inflatum): four fatal cases in leukemic patients. *J Clin Microbiol* 33, 3290-3295.
- An Z, Farman ML, Budde A, Taura S, Leong SA. 1996. New cosmid vectors for library construction, chromosome walking and restriction mapping in filamentous fungi. *Gene* 176, 93-96.
- Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S. 1998. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 36, 2413-2418.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshof PM. 1992. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 38, 70-76.
- Berbee ML, Yoshimura A, Sugiyama J, Taylor JW. 1995. Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia* 87, 210-222.
- Berenguer J, Díaz-Guerra TM, Ruiz-Díez B, Bernaldo de Quirós JC, Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV. 1996. Genetic dissimilarity of two fluconazole-resistant *Candida albicans* strains causing meningitis and oral candidiasis in the same AIDS patient. *J Clin Microbiol* 34, 1542-1545.
- Berenguer J, Rodríguez-Tudela JL, Richard C, Alvárez M, Sanz MA, Gaztelurrutia L, Ayats J, Martínez-Suárez JV. 1997. Deep infections caused by *Scedosporium prolificans*. *Medicine* 76, 256-265.
- Birch M, Anderson MJ, Denning DW. 1995. Molecular typing of *Aspergillus* species. *J Hosp Infect* 30, 339-351.
- Birnboim HL, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bos CJ, Stadler D. 1996. Mutation. En *Fungal genetics: principles and practice*, ed por Bos CJ. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, págs. 13-42.
- Bowman BH. 1993. A model PCR/probe system for the identification of fungal pathogens. En *Diagnostic molecular microbiology-principles and applications*, ed por Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. American Society for microbiology, Washington, DC, págs. 423-430.
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 22, 525-564.
- Bullock WO, Fernández JM, Short JM. 1987. A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- Carlton BC, Brown BJ. 1981. Gene mutation. En *Manual of methods for general bacteriology*, ed por Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB. American Society for microbiology, Washington, DC, págs. 222-242.
- Chakraborty BN, Patterson NA, Kapoor M. 1991. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Can J Microbiol* 37, 858-863.
- Chambers C, Dutta SK, Crouch RJ. 1986. *Neurospora crassa* ribosomal DNA: sequence analysis of internal transcribed spacer and comparison with *N. intermedia* and *N. sitophila*. *Gene* 44, 159-164.
- Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, Cornet M, Thien HV, Gluckman E, Brucker G, Latgé JP. 1998. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J Clin Microbiol* 36, 1494-1500.
- Clancy CJ, Yu YC, Lewin A, Nguyen MH. 1998. Inhibition of RNA synthesis as a therapeutic strategy against *Aspergillus* and *Fusarium*. Demonstration of *in vitro* synergy between rifabutin and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 509-513.

- Clutterbuck AJ. 1995. Molecular biology. En *The growing fungus*, ed por Gow NAR, Gadd GM. Chapman y Hall, Londres, págs. 255-274.
- Crowhurst RN, Hawthorne BT, Rikkerink EHA, Templeton MD. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Curr Genet* 20, 391-396.
- Cuenca-Estrella M, Ruiz-Díez B, Martínez-Suárez JV, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL. 1999. Comparative in-vitro activity of voriconazole (UK.109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. *J Antimicrob Chemother* 43, 149-151.
- Davis RH, De Serres FJ. 1970. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol* 17A, 79-143.
- De Hoog GS, Bowman B, Graser Y, Haase G, El Fari M, Gerrits Van Den Ende HG, Melzer-Krick B, Untereiner WA. 1998. Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. *Med Mycol* 36 (1), 52-56.
- Del Sorbo G, Andrade AC, Van Nistelrooy JGM, Van Kan JAL, Balzi E, de Waard MA. 1997. Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Mol Gen Genet* 254, 417-426.
- Eliopoulos GM, Moellering RC. 1996. Antimicrobial combinations. En *Antibiotics in laboratory medicine*, ed por Lorian V. Williams and Wilkins, Baltimore, págs. 330-396.
- Espinel-Ingroff A, Kerkering TM. 1991. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 29, 393-394.
- Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin B, Dixon D, Fothergill A, Paetznick V, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. 1995. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 314-319.
- Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper C, Fothergill A, McGinnis MR, Menezes P, Messer SA, Nelson PW, Odds FC, Pasarell L, Peter J, Pfaller M, Rex JH, Rinaldi MG, Shankland GS, Walsh TJ, Weitzman I. 1997. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 35, 139-143.
- Fincham JRS. 1989. Transformation in fungi. *Microbiol Rev* 53, 148-170.
- Geiser DM, Arnold ML, Timberlake WE. 1996. Wild chromosomal variants in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 29, 293-300.
- Gems DH, Johnstone IL, Clutterbuck AJ. 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98, 61-67.
- Gems DH, Clutterbuck AJ. 1993. Co-transformation with autonomously-replicating helper plasmids facilitates gene cloning from an *Aspergillus nidulans* gene library. *Curr Genet* 24, 520-524.
- Ghého E, de Hoog GS. 1991. Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. *J Mycol Med* 118, 3-9.
- Girardin H, Latge JP, Srikantha T, Morrow B, Soll DR. 1993. Development of DNA probes for fingerprinting *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 31, 1547-1554.
- Girardin H, Sarfati J, Traore F, Camet JD, Derouin F, Latge JP. 1994. Molecular epidemiology of nosocomial invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 32, 684-690.
- Goodwin PH, Annis SL. 1991. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Appl Environ Microbiol* 57, 2482-2486.

- Hanahan D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. En DNA cloning. A practical approach, ed por Glover DH. IRL Press, Oxford, págs. 109-136.
- Holden DW. 1994. DNA miniprep method for *Aspergillus fumigatus* (and other filamentous fungi). En Molecular biology of pathogenic fungi, ed por Maresca B, Kobayashi GS. Telos Press, Nueva York, págs. 3-4.
- Howell SA, Barnard RJ, Humphreys F. 1999. Application of molecular typing methods to dermatophyte species that cause skin and nail infections. J Med Microbiol 48, 33-40.
- Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R. 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. CABIOS 8, 189-191.
- Hughes CE, Harris C, Peterson LR, Gerding DN. 1984. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against *Aspergillus* spp. by tetracycline analogs. Antimicrob Agents Chemother 26, 837-840.
- Issakainen J, Jalava J, Eerola E, Campbell CK. 1997. Relatedness of *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and *Graphium* pro parte based on SSU rDNA sequences. J Med Vet Mycol 35, 389-398.
- Jahn B, Koch A, Schmidt A, Wanner G, Gehringer H, Bhakdi S, Brakhage AA. 1997. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. Infect Immun 65, 5110-5117.
- Kawamura C, Tsujimoto T, Tsuge T. 1999. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. Mol Plant-Microbe Interact 12, 59-63.
- Kerr KG. 1994. The rap on REP- PCR-based typing systems. Rev Med Microbiol 5, 233-244.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, Gams W, Börner T, Kubicek CP. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivate of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proc Natl Acad Sci 93, 7755-7760.
- Kwon-Chung KJ, Goldman WE, Klein B, Szanislo PJ. 1998. Fate of transforming DNA in pathogenic fungi. Med Mycol 36 (1), 38-44.
- Latgé JP, Debeaupuis JP, Safarti J, Paris S. 1998. Variability in the human opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. En Molecular variability of fungal pathogens, ed por Bridge P, Couteaudier Y, Clarkson J. CAB International, Nueva York, págs. 121-131.
- Lennon PA, Cooper CR, Salkin IF, Lee SB. 1994. Ribosomal DNA internal transcriber spacer analysis supports synonymy of *Scedosporium inflatum* and *Lomentospora prolificans*. J Clin Microbiol 32, 2413-2416.
- Lobuglio KF, Taylor JW. 1995. Phylogeny and PCR identification of the human pathogenic fungus *Penicillium marneffe*. J Clin Microbiol 33, 85-89.
- Loudon KW, Burnie JP, Coke AP, Matthews RC. 1993. Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. J Clin Microbiol 31, 1117-1121.
- MacNeil L, Kauri T, Robertson W. 1995. Molecular techniques and their potential application in monitoring the microbiological quality of indoor air. Can J Microbiol 41, 657-665.
- Malloch D, Salkin IF. 1984. A new species of *Scedosporium* associated with osteomyelitis in humans. Mycotaxon 21, 247-255.
- Manavathu EK, Cutright J, Chandrasekar PH. 1999. Comparative study of susceptibilities of germinated and

- ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. J Clin Microbiol 37, 858-861.
- Manczinger L, Komonyi O, Antal Z, Ferenczy L. 1997. A method for high-frequency transformation of *Trichoderma viride*. J Microbiol Methods 29, 207-210.
- McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. 1982. *Pseudallescheria* Negroni and Fischer, 1943 and its later synonym *Petriellidium* Malloch, 1970. Mycotaxon 14, 94-102.
- McGinnis MR, Rinaldi MG. 1996. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids. En Antibiotics in laboratory medicine, ed por Lorian V. Williams and Wilkins, Baltimore, págs. 176-211.
- Meshulam T, Levitz SM, Christin L, Diamond RD. 1995. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2, 3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). J Infec Dis 172, 1153-1156.
- Meyer W, Koch A, Niemann C, Beyermann B, Epplen JT, Borner T. 1991. Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. Curr Genet 19, 239-242.
- Meyer W, Lieckfeldt E, Kuhls K, Freedmann EZ, Borner T, Mitchell TG. 1993. DNA and PCR-fingerprinting in fungi. EXS 67, 311-320.
- Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys R. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 31, 2274-2280.
- Mitchell TG, Sandin RL, Bowman BH, Meyer W, Merz WG. 1994. Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology. J Med Vet Mycol 32 (1), 351-356.
- Mugnier J. 1998. Molecular evolution and phylogenetic implications of ITS sequences in plants and fungi. En Molecular variability of fungal pathogens, ed por Bridge P, Couteaudier Y, Clarkson J. CAB International, Nueva York, págs. 253-278.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; proposed standard M38-P. NCCLS, Pennsylvania, USA.
- Odds FC, Van Gerven F, Espinel-Ingroff A, Bartlett MS, Ghannoum MA, Lancaster MV, Pfaller MA, Rex JM, Rinaldi MG, Walsh TJ. 1998. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi *in vitro* and antifungal treatment outcomes in animal infection models. Antimicrob Agents Chemother 42, 282-288.
- O'Donnell K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). Curr Genet 22, 213-220.
- Ozeki K, Kyoya F, Hizume K, Kanda A, Hamachi M, Nunokawa Y. 1994. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation. Biosci Biotech Biochem 58, 2224-2227.
- Perfect JR, Schell WA. 1996. The new fungal opportunists are coming. Clin Infect Dis 22 (2), 112-118.
- Pfaller MA. 1995. Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. Clin Infec Dis 20, 1535-1539.
- Polak A, Dixon DM. 1989. Loss of melanin in *Wangiella dermatitidis* does not result in greater susceptibility to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 33, 1639-1640.
- Power EGM. 1996. RAPD typing in microbiology- a technical review. J Hosp Infec 34, 247-265.

- Punt PJ, Oliver RP, Dingemanse MA, Pouwels PH, Cees AMJJ, van den Hondel C. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56, 117-124.
- Rath PM, Müller KD, Dermoumi H, Ansorg R. 1997. A comparison of methods of phenotypic and genotypic fingerprinting of *Exophiala dermatitidis* isolated from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 46, 757-762.
- Reis Bogo M, Henning Vainstein M, Lima Aragao FJ, Rech E, Schrank A. 1996. High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 142, 123-127.
- Riach MBR, Kinghorn JR. 1996. Genetic transformation and vector developments in filamentous fungi. En *Fungal genetics: principles and practice*, ed por Bos CJ. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, págs. 209-233.
- Riggle PJ, Kumamoto CA. 1998. Genetic analysis in fungi using restriction-enzyme-mediated integration. *Curr Opin Microbiol* 1, 395-399.
- Rodriguez E, Symoens F, Mondon P, Mallie M, Piens MA, Lebeau B, Tortorano AM, Chaib F, Carlotti A, Villard J, Viviani MA, Chapuis F, Nolard N, Grillot R, Bastide JM. 1999. Combination of three typing methods for the molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* infections. *J Med Microbiol* 48, 181-194.
- Rohe M, Searle J, Newton AC, Knogge W. 1996. Transformation of the plant pathogenic fungus *Rhynchosporium secalis*. *Curr Genet* 29, 587-590.
- Rossolini GM, Riccio ML, Gallo E, Galeotti CL. 1992. *Kluyveromyces lactis* rDNA as a target for multiple integration by homologous recombination. *Gene* 119, 75-81.
- Ruiz-Díez B, Martín-Díez F, Rodríguez-Tudela JL, Álvarez M, Martínez-Suárez JV. 1997. Use of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and PCR-fingerprinting for genotyping a *Scedosporium prolificans* (*inflatum*) outbreak in four leukemic patients. *Curr Microbiol* 35, 189-190.
- Ruiz-Díez B, Martínez-Suárez JV. 1999. Electrotransformation of the human pathogenic fungus *Scedosporium prolificans* mediated by repetitive rDNA sequences. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25, 275-282.
- Salkin IF. 1975. Adaptation to cycloheximide: in vitro studies with filamentous fungi. *Can J Microbiol* 21, 1413-1419.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- San Millán R, Quindós G, Garaizar J, Salesa R, Guarro J, Pontón J. 1997. Characterization of *Scedosporium prolificans* clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 35, 2270-2274.
- Sánchez O, Aguirre J. 1996. Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet Newsl* 43, 48-51.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74, 5463-5467.
- Shiotani H, Tsuge T. 1995. Efficient gene targeting in the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Mol Gen Genet* 248, 142-150.
- Skatrud PL, Queener SW, Carr LG, Fisher DL. 1987. Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium*. *Curr Genet* 12, 337-348.

- Spreadbury CL, Bainbridge BW, Cohen J. 1990. Restriction fragment length polymorphisms in isolates of *Aspergillus fumigatus* probed with part of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene complex of *Aspergillus nidulans*. J Gen Microbiol 136, 1991-1994.
- Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. 1998. Guide to Clinically Significant Fungi. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Tang CM, Cohen J, Rees AJ, Holden DW. 1994. Molecular epidemiological study of invasive pulmonary aspergillosis in a renal transplantation unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13, 318-321.
- Tateishi T, Murayama SY, Otsuka F, Yamaguchi H. 1996. Karyotyping by PFGE of clinical isolates of *Sporothrix schenckii*. FEMS Immunol Med Microbiol 13, 147-154.
- Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. 1999. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. Clin Microbiol Rev 12, 126-146.
- Tsuge T, Nishimura S, Kobayashi H. 1990. Efficient integrative transformation of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* mediated by the repetitive rDNA sequences. Gene 90, 207-214.
- Torres RA, Ganai M, Hemleben V. 1990. GC Balance in the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal RNA genes. J Mol Evol 30, 170-181.
- Torres-Guerrero H, Arenas-López G. 1998. UV irradiation induced high frequency of colonial variants with altered morphology in *Sporothrix shenckii*. Med Mycol 36, 81-87.
- Vartivarian SE. 1992. Virulence properties and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi. Clin Infect Dis 14 (1), 30-36.
- Vassart G, Georges M, Monsieur R, Brocas H, Lequarre AS, Christophe D. 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. Science 235, 683-684.
- Vieira J, Messing J. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. Methods Enzymol 153, 3-11.
- Viviani MA, De Marie S, Graybill JR, Yamaguchi H, Anaissie E, Caillot D. 1998. New approaches to antifungal chemotherapy. Med Mycol 36 (1), 194-206.
- Vora S, Chauhan S, Brummer E, Stevens DA. 1998. Activity of voriconazole combined with neutrophils or monocytes against *Aspergillus fumigatus*: effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Antimicrob Agents Chemother 42, 2299-2303.
- Walsh TJ, Dixon DM. 1989. Nosocomial aspergillosis: environmental microbiology, hospital epidemiology, diagnosis and treatment. Eur J Epidemiol 5, 131-142.
- Walsh TJ, Peter J, McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Pizzo PA. 1995. Activities of amphotericin B and antifungal azoles alone and in combination against *Pseudallescheria boydii*. Antimicrob Agents Chemother 39, 1361-1364.
- Wedde M, Müller D, Tinteln K, de Hoog GS, Stahl U. 1998. PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strains. Med Mycol 36, 61-67.
- Weising K, Atkinson RG, Gardner RC. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: A critical evaluation. PCR Methods Applic 4, 249-255.
- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primer. Nucleic Acids Res 18, 7213-7218.
- Wheeler MH, Bell AA. 1988. Melanins and their importance in pathogenic fungi. En Currents topics in medical mycology, ed por McGinnis MR. Springer-Verlag, Nueva York, vol 2, págs. 338-387.

- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En PCR protocols, a guide to methods and applications, ed por Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, San Diego, págs. 315-322.
- Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymol 218, 704-740.
- Wood GM, McCormak JG, Muir BD, Ellis DH, Ridley MF, Pritchard R, Harrison R. 1992. Clinical features of human infections with *Scedosporium inflatum*. Clin Infect Dis 14, 1027-1033
- Yoon CS, Glawe DA. 1993. Pretreatment with RNase to improve PCR amplification of DNA using 10-mer primers. Biotechniques 14, 908-910.

